



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Determinación de la composición química y actividad antifúngica de extractos vegetales obtenidos de *Hypericum perforatum*, *Valeriana officinalis*, *Chamaemelum nobile*, *Achillea millefolium* y *Salvia officinalis*

Determination of the chemical composition and antifungal activity of plant extracts obtained from *Hypericum perforatum*, *Valeriana officinalis*, *Chamaemelum nobile*, *Achillea millefolium* and *Salvia officinalis*

Autor/es

José Ramón Gimeno Aguirregomozcorta

Director/es

María Eugenia Venturini Crespo
Marcos Hernández Suárez

Facultad de Veterinaria

2016

AGRADECIMIENTOS

Gracias especialmente a la Dra. María Eugenia Venturini Crespo y al Dr. Marcos Hernández Suárez por guiarme durante la realización de este proyecto, por las técnicas microbiológicas y químicas aprendidas, de las cuales he aprendido mucho, y por el trato que he recibido durante este periodo de tiempo.

Muchas gracias a todos los profesores, compañeros y personal del departamento de Vegetales de la Facultad de Veterinaria y del Parque Científico Tecnológico de Aula Dei por toda su paciencia y su colaboración en ayudarme a realizar mis objetivos en este proyecto.

Y por último, también quisiera agradecer a mis padres y mi hermana todo el apoyo mostrado y por sus ánimos en los momentos más difíciles durante la realización del proyecto, y a mis amigos, por los buenos momentos vividos y por todos sus ánimos.

INDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 LA PODREDUMBRE MARRÓN.....	3
1.2 TRATAMIENTOS PARA REDUCIR LA PODREDUMBRE MARRÓN.....	4
1.2.1 Fungicidas químicos.....	4
1.2.2 Control biológico.....	5
1.2.3 Aceites esenciales.....	5
1.2.4 Extractos vegetales.....	6
1.2.5 Agentes desinfectantes biocidas.....	8
1.2.6 Tratamientos físicos en post-cosecha.....	9
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.....	13
3.1 EXTRACTOS VEGETALES.....	13
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES.....	13
3.2.1 Determinación de compuestos fenólicos.....	13
3.2.2 Determinación de la capacidad antioxidante.....	14
3.2.3 Determinación de principios activos por cromatografía líquida UPLC.....	15
3.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DE LOS EXTRACTOS VEGETALES.....	16
3.4 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL EXTRACTO DE SALVIA Y ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS.....	17
3.4.1 Caracterización microbiológica del extracto de salvia.....	17
3.4.1.1 Recuento y aislamiento de bacterias y levaduras.....	17
3.4.1.2 Determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los microorganismos aislados del extracto de salvia.....	17
3.4.1.2.1 Solución de esporas de <i>M. fructicola</i>	18
3.4.1.2.2 Microorganismos del extracto de salvia.....	18
3.4.1.2.3 Técnica de detección de la actividad antifúngica.....	18
3.4.1.3 Identificación de posibles agentes de biocontrol.....	18
3.5 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA <i>IN VIVO</i>	21
3.5.1 Evaluación de podredumbres.....	23
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	27
4.1.1 Determinación de los compuestos fenólicos.....	27
4.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante.....	28
4.1.3 Principios activos por cromatografía líquida UPLC.....	29
4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i>	32
4.3 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL EXTRACTO DE SALVIA.....	34

4.3.1	Recuento de bacterias y levaduras.....	35
4.3.2	Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los microorganismos antagonistas	35
4.3.2.1	Identificación de la bacteria y levadura con actividad antagonista	36
4.3	INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS CON EXTRACTOS VEGETALES EN LA CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA Y EN LOS PARAMETROS FISIOLÓGICOS DE LOS MELOCOTONES	40
4.4	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA <i>IN VIVO</i>	42
5.	CONCLUSIONES.....	45
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	46

RESUMEN

La podredumbre marrón ocasionada por las distintas especies de *Monilinia spp.* (*M. fructicola*, *M. laxa* y *M. fructigena*) causa importantes pérdidas durante la conservación post-cosecha de frutas. Como alternativa a los fungicidas se han estudiado diversos tratamientos, entre los que destacan el uso de extractos vegetales y el biocontrol.

En este proyecto se ha determinado la composición química y la actividad antifúngica de distintos extractos vegetales de hipérico (*Hypericum perforatum*), manzanilla (*Chamaemelum nobile*), milenrama (*Achillea millefolium*), salvia (*Salvia officinalis*) y valeriana (*Valeriana officinalis*) tanto comerciales como obtenidos en laboratorio. La caracterización química incluyó el contenido total en compuestos fenólicos, la capacidad antioxidante y la cuantificación de distintos principios activos (eugenol, cumarina, terpinen-4-ol, geraniol, linalol, timol, limoneno y α -pineno) por UPLC. El contenido en compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los extractos comerciales fue muy baja en comparación con los extractos extraídos en laboratorio. Esta diferencia puede deberse al tipo de solvente utilizado, que en el caso de los extractos comerciales pensamos que fue agua, mientras que los extractos obtenidos en laboratorio fueron extraídos con una solución de metanol:agua (80:20). Probablemente por esta misma razón, tampoco se detectó ningún principio activo en los extractos comerciales y sí en los de laboratorio, dejando abierta la posibilidad de que haya otros compuestos con efecto antimicrobiano que no han sido analizados en este proyecto. Los extractos comerciales, especialmente el de salvia, presentaron una ligera inhibición del crecimiento *in vitro* de *M. laxa* y *M. fructicola*, aunque a concentraciones elevadas. Dentro de la microbiota del extracto de salvia detectamos una bacteria con actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *M. fructicola* que fue identificada como *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, perteneciente por tanto, a un género con conocidas especies estudiadas como agentes de biocontrol, y que podría contribuir a los efectos antifúngicos de estos extractos. Finalmente, se comparó la eficacia del extracto de salvia frente a la de dos ácidos orgánicos (acético y peracético) en la inhibición de podredumbres post-cosecha en melocotones, tratados y no tratados en precosecha con extractos vegetales. Los resultados *in vivo* indicaron que el tratamiento más eficaz es el ácido acético, mientras que la combinación de tratamientos precosecha con extractos vegetales junto a la aplicación de salvia en post-cosecha disminuye significativamente la aparición de podredumbres.

ABSTRACT

Brown rot caused by *Monilinia* species (*M. fructicola*, *M. laxa* and *M. fructigena*) causes significant losses during the post-harvest storage of fruits. As an alternative to fungicides, several treatments have been studied, among them, the use of plant extracts and biocontrol appears promising.

In this study we have determined the chemical composition and antifungal activity of different commercial and homemade plant extracts from hypericum (*Hypericum perforatum*), chamomile (*Chamaemelum nobile*), yarrow (*Achillea millefolium*), sage (*Salvia officinalis*) and valerian (*Valeriana officinalis*). The chemical characterization included the total content of phenols, the antioxidant capacity and the quantification of different active compounds (eugenol, coumarin, terpinen-4-ol, geraniol, linalool, thymol, limonene and α -pinene) by UPLC. The content of phenolic compounds and the antioxidant capacity of the commercial extracts were very low compared to that of the extracts extracted in laboratory. This difference may be due to the type of solvent used, which in the case of the commercial extracts we thought could be water, while the ones obtained in the laboratory were extracted with a solution of methanol:water (80:20). Probably for the same reason, no active compounds were detected in the commercial extracts while they were detected in the laboratory ones. So, the possibility of other antimicrobial compounds, with antimicrobial effect, that have not been analysed in this study, have to be studied. Commercial extracts, especially that from sage, showed a *M. laxa* and *M. fructicola* slight *in vitro* growth inhibition, although at high concentrations. Within the sage extract microbiota we detected a bacterium with an *in vitro* antimicrobial activity against *M. fructicola*, that was identified as *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*. This species belongs to a genus with known species studied as biocontrol agents, and could contribute to the antifungal effects of this extract. Finally, the efficacy of sage extract was compared with that of two organic acids (acetic and peracetic) in the post-harvest rot inhibition in peaches, treated and not treated in pre-harvest with plant extracts. *In vivo* results showed that the most effective treatment was acetic acid while the combination of pre-harvest treatments with plant extracts beside the application of post-harvest sage significantly decreases the rot development.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA PODREDUMBRE MARRÓN

La podredumbre marrón provoca importantes pérdidas en un gran número de frutas de hueso (melocotón, nectarina, cereza, ciruela, albaricoque,...) tanto durante la precosecha como en post-cosecha (más severas en post-cosecha), siendo una de las enfermedades más prevalente en estos frutos. La enfermedad está causada por distintas especies de hongos fitopatógenos del genero *Monilinia*. Las pérdidas debidas a esta enfermedad alcanzan hasta un 80-100% en años donde las condiciones climáticas son favorables y en cultivos de variedades tardías y una media de 10-30% en condiciones menos favorables (Gell, 2007; Larena *et al.*, 2005).

Monilinia spp. se propaga a través de agentes como el viento, agua, insectos, pájaros y el propio ser humano, además del contacto directo con otros frutos infectados (Xu *and* Robinson, 2000). Hay más de 30 especies relacionadas con este género y tres se han considerado de gran importancia económica por los daños que produce (Poniatowska *et al.*, 2013):

- a. ***Monilinia fructicola***: presente en algunos países de Asia, América, además de Australia y Nueva Zelanda. En 2006, la Organización Nacional de Protección de Plantas (NPPO) confirmó la presencia de *M. fructicola* en Cataluña. Esta especie tiene más incidencia en frutales de hueso como melocotones, nectarinas, albaricoques y ciruelas, y al igual que las demás especies también afecta a las flores y ramillas (Muñoz *et al.*, 2008).
- b. ***Monilinia laxa***: especie originaria de Europa, se sabe que también se ha extendido al Pacífico Noroeste de Estados Unidos. Provoca, preferentemente, marchitez de las flores y ramillas de frutos como albaricoques, almendros y cerezos.
- c. ***Monilinia fructigena***: al igual que *M. laxa*, procede de Europa, marchita flores y ramillas y afecta a manzanas, peras y cerezas. Penetra a través de heridas en la piel de la fruta y mediante el contacto con otras frutas infectadas.

Los principales hospedadores de *M. fructicola* son: melocotón (*Prunus persica* L.), nectarina (*Prunus persica* var. nectarina), albaricoque (*Prunus armeniaca* L.) y ciruela (*Prunus domestica* L.). *M. fructigena* es más frecuente en manzanas (*Pyrus malus* L.), peras (*Pyrus communis* L.) y cerezas (*Prunus avium* L.). *M. laxa* prefiere albaricoques, almendros (*Prunus dulcis*) y cerezos. *M. laxa* afecta preferentemente a flores y ramillas mientras que *M. fructigena* tiene mayor incidencia en frutos de pepita (Muñoz *et al.*, 2008).

Respecto a sus condiciones de crecimiento, Casals *et al.* (2010a), evaluaron el efecto de la

temperatura y la actividad de agua en la germinación de las esporas sexuales de las tres especies de *Monilina spp.*, y todas fueron capaces de germinar a un intervalo alto de temperatura (entre 0 y 35 °C) con una actividad de agua del 99 %, pero no hay germinación a partir de los 38 °C. Las temperaturas que oscilan entre los 15 y 30 °C son las óptimas para el desarrollo del hongo. El rango varía de 4 a 30 °C, lo que no significa que las infecciones a flores y frutos se inhiban a temperaturas más bajas. En el caso de *M. fructigena* y *M. fructicola*, se alcanza el 85-99 % de germinación a 25 °C durante dos horas de incubación y con una actividad de agua del 99 %, mientras que *M. laxa* necesita 4 horas de incubación mencionadas anteriormente.

En España, las especies que más pérdidas post-cosecha ocasionan en nectarinas y melocotones son *M. laxa* y *M. fructicola* (Figura 1.1) con valores entorno al 60 %. Estas pérdidas también tienen lugar durante el almacenamiento y el transporte y son más severas que las pérdidas precosecha (Casals *et al.*, 2010).



Figura 1.1. Melocotón afectado por *M. laxa* (izqda.) y nectarina afectada por *M. fructicola* (drcha.)

1.2 TRATAMIENTOS PARA REDUCIR LA PODREDUMBRE MARRÓN

1.2.1 Fungicidas químicos

El control de la podredumbre marrón se basa principalmente en la aplicación precosecha de fungicidas químicos, de la familia de los bencimidazoles, triazoles y dicarboximas (iprodiona). Se aplican mayormente en campo ya que su uso no está autorizados durante el periodo de post-cosecha, salvo en Estados Unidos, donde está permitido el uso de fungicidas de riesgo reducido, como la fenhexamida o el fludioxonil, gracias a su baja toxicidad para el medio ambiente y la salud humana (Förster *et al.*, 2007)

La aplicación de fungicidas es clave para controlar esta enfermedad. Sin embargo, la creciente preocupación para la salud humana y el medio ambiente asociados con el uso de pesticidas, el aumento de la resistencia de algunas cepas de *M. fructicola*, y la falta de

aprobación en post-cosecha de los fungicidas más eficientes sobre frutas y hortalizas, ha aumentado los esfuerzos por desarrollar una alternativa económica y eficiente para el control de este tipo de enfermedades (Hou *et al.*, 2010; Sanzani *et al.*, 2010).

1.2.2 Control biológico

El control biológico es una alternativa eficaz frente al uso de fungicidas químicos. La investigación sobre el control biológico de enfermedades post-cosecha consiste principalmente en el aislamiento del microorganismo (bacteria, moho o levadura) que sea antagonista frente al fitopatógeno. Las principales características de un agente antagonista son: un rápido crecimiento y colonización de las heridas recientes y un elevado nivel de supervivencia y crecimiento en superficies de fruta intactas y heridas para evitar que los agentes fitopatógenos puedan desarrollarse (Droby *et al.*, 2016).

Se han identificado numerosos antagonistas microbianos de microorganismos fitopatógenos post-cosecha. *Bacillus subtilis*, es efectivo como fungicida en el control de la podredumbre marrón en melocotón, capaz de producir una sustancia antibiótica tóxica para *M. fructicola* (Zhou *et al.*, 2008). Distintas cepas de *Pseudomonas syringae*, aisladas de hojas de manzana, fueron eficaces en la inhibición tanto de la podredumbre marrón como de la podredumbre por *Rhizopus* en melocotones. Según un estudio de Karabulut and Baykal (2003), un total de 103 levaduras aisladas en melocotones heridos fueron seleccionadas para un control biológico contra *M. fructicola* y una de las mejores cepas, *Kloeckera apiculata*, mostró una reducción significativa de la podredumbre marrón en melocotones inoculados.

1.2.3 Aceites esenciales

Entre los productos de origen vegetal que presentan actividad antimicrobiana se encuentran los aceites esenciales. Estos son líquidos aromáticos aceitosos obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas, formados por mezclas complejas de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos. Además son compuestos olorosos, muy solubles en alcohol y poco solubles en agua y para su extracción se pueden utilizar distintos solventes como acetato, etanol, y cloruro de etileno (Sauceda *et al.*, 2011). Lazar-Baker *et al.*, 2011, determinaron el efecto del aceite esencial de mirto de limón frente al crecimiento micelial y la germinación de esporas de *M. fructicola*. Este aceite tuvo una gran actividad antifúngica contra el moho en ensayos *in vitro*, y una menor

actividad en ensayos *in vivo*.

1.2.4 Extractos vegetales

Los extractos vegetales se están aplicando cada vez más en el entorno agrícola como alternativa al uso de fungicidas químicos debido a que no alteran el medio ambiente, sus residuos son fáciles de degradar y son eficaces contra insectos e incluso en el control de algunos microorganismos fitopatógenos en post-cosecha. Los extractos están compuestos por un grupo de sustancias extraídas de diferentes partes de plantas (raíces, ramas, semillas, hojas, frutos, etc.) a partir de solventes como el metanol y agua, los cuales han ganado recientemente popularidad y un interés científico por su actividad antibacteriana y antifúngica. Además, gracias a su origen natural, permiten obtener productos agrícolas con una gran calidad para la exportación a países donde el empleo de fungicidas de síntesis está siendo restringido (Gatto *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2012). Según Fu *et al.* (2016), el extracto de berberina actúa de manera eficiente contra el crecimiento *in vitro* de *M. fructicola*. Otros extractos vegetales se pueden obtener a partir de plantas como (<http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/>):

- *Achillea millefolium* (milenrama): su contenido en azuleno y flavonoides tiene propiedades antiinflamatorias, las lactonas son responsables de su acción antimicrobiana y los taninos tienen propiedades astringentes. Su aplicación puede ayudar al control de oidio, ya que potencia el desarrollo de autodefensa de la planta (Beato *et al.*, 1999).
- *Chamaemelum nobile* (manzanilla): su infusión se utiliza como fungicida para el control de hongos que causan pudriciones en diferentes plantas. El aceite de manzanilla es antibacteriano y fungicida a concentraciones menores a 25 mg/mL (Berry M., 1995)
- *Hypericum perforatum* (hipérico): los extractos de hipérico pueden ser capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*. La hipericina, además de ser el responsable del color rojo del aceite de hipérico, es capaz de inhibir infecciones como el herpes y el virus de la hepatitis B, y pierde potencia cuando los extractos que la contienen se encuentran almacenados durante más de seis semanas a altas temperaturas (Peiro *et al.*, 2010).

- *Salvia officinalis* (salvia): Su principal actividad es como antiséptico. La hoja de salvia posee acción antibacteriana y fungicida contra fitopatógenos debido principalmente a su aceite esencial y acción antiviral por su riqueza en compuestos diterpénicos (Vazquez *et al.*, 2009).
- *Valeriana officinalis* (valeriana): se ha utilizado ampliamente como ansiolítico, promotor del sueño, además de poseer efectos antidepresivos. La valeriana contiene diversos compuestos incluyendo aceite esencial, ácido valerénico, ácidos fenólicos y flavonoides (Dugahneh *et al.*, 2013).

Las plantas aromáticas y medicinales suelen presentar una serie de compuestos bioquímicos, los principios activos, con poder insecticida, insectífugo, fungicida, antibacteriano, nematocida y/o larvicida, según el *Phytobotanical and ethnobotanical databases del Agricultural Research Service* del USDA (United States Department of Agriculture). En la siguiente tabla (Figura 1.2) se resumen las principales propiedades sobre plagas y enfermedades de algunos principios activos presentes en plantas aromáticas y medicinales:

PLANTAS	COMPUESTO	INSECTICIDA	INSECTÍFUGO	FUNGICIDA	ANTIBACTERIANO	NEMATICIDA	LARVICIDA
Salvia Milenrama Hipérico	Alfa-pineno	X			X		
Milenrama	Eugenol	X	X	X	X		
Salvia Hipérico	Geraniol	X	X	X	X	X	
Salvia Manzanilla Milenrama Hipérico	Limoneno	X	X	X	X	X	
Hipérico	Linalool	X	X	X	X	X	X
Milenrama Hipérico	Terpinel-4-ol		X	X	X	X	
Salvia	Timol	X	X	X	X	X	X

Figura 1.2. Principales propiedades sobre plagas y enfermedades de los distintos compuestos detectados en distintas especies de plantas. **Fuentes:** “*Phytobotanical and ethnobotanical databases*” de *Agricultural Research Service del USDA* (United States Department of Agriculture).

Los metabolitos producidos por las plantas y sus extractos son una alternativa prometedora debido a la amplia cantidad y variedad de compuestos bioactivos, los cuales son conocidos por poseer actividad antimicrobiana para la protección de las plantas siendo una de sus acciones la inducción de resistencia en éstas (da Cruz Cabral *et al.*, 2013; Sanzani *et al.*, 2010). Un ejemplo

son los compuestos fenólicos, entre los que destacan los flavonoides, que son potentes antioxidantes presentes en los órganos de las plantas, incluida la fruta. Nicosia *et al.* (2016), indicaron que los extractos de piel de granada son muy efectivos como inhibidores naturales de bacterias y mohos fitopatógenos. Algunos compuestos químicos presentes en las plantas, como los compuestos fenólicos presentan actividad antimicrobiana. El timol, los terpenoides y el ácido antémico son fenoles simples que actúan frente a microorganismos como *S. aureus* y *Salmonella*. Derivados fenólicos como las quinonas (hipericina), taninos y cumarinas también poseen actividad antimicrobiana contra bacterias y virus (Domingo and Lopez-Brea, 2003).

1.2.5 Agentes desinfectantes biocidas

El saneamiento tras la cosecha es de vital importancia para todos los productos frescos, en los que se pueden reducir las pérdidas por deterioro en un 50 % o más (Feliziani *et al.*, 2016). Entre las alternativas al desinfectante más comúnmente empleado, el hipoclorito sódico, nos encontramos con los ácidos orgánicos. Estos ácidos pueden ser aplicados mediante procesos tales como pulverización e inmersión (Feliziani *et al.*, 2016).

El uso de ácido acético como agente desinfectante ha mostrado actividad antimicrobiana frente a los principales patógenos en post-cosecha de frutas (Feliziani *et al.*, 2016). Su potencia depende de las condiciones de utilización y su actividad aumenta con la temperatura. En medios de cultivo enriquecidos con 3 g/L de ácido acético se inhibió completamente el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* (Kang *et al.*, 2013). La inhibición de este hongo por el ácido acético se aceleró junto a una disminución en el pH de 6 a 4, lo que sugiere que la inhibición podría ser mejorada por la forma no disociada de este ácido.

La actividad desinfectante del ácido peracético, o peroxiacético, radica en su capacidad oxidante sobre la membrana externa de las bacterias, endosporas y levaduras. El mecanismo de oxidación consiste en la transferencia de electrones de la forma oxidada del ácido a los microorganismos, provocando así su inactivación o incluso su muerte. Sisquella *et al.* (2013) utilizaron ácido peracético a una concentración de 200 mg/L junto con agua caliente a 40 °C durante 40 s. Los resultados mostraron un control completo de la podredumbre marrón cuando la fruta fue tratada al mismo tiempo que la inoculación. Sin embargo, cuando la fruta permaneció inoculada en un periodo de 24 a 72 horas, no consiguieron controlar la enfermedad, demostrando que este tratamiento no tenía un efecto curativo.

El ácido oxálico es utilizado en la industria alimentaria como un compuesto antioxidante y antimicrobiano ya que puede inhibir enzimas responsables del pardeamiento y hongos fitopatógenos. En un estudio, realizado por Ruiz-Jimenez *et al.* (2014), se analizó los efectos beneficiosos de la aplicación de ácido oxálico para retrasar el deterioro de la calidad y extender la vida útil de varias frutas y verduras. La inmersión de alcachofas en una solución de ácido oxálico retrasó el deterioro post-cosecha reduciendo la respiración, retrasando el cambio de color y la degradación de la clorofila, y reduciendo las poblaciones antimicrobianas, sin influir en el contenido total de fenol ni en la actividad antioxidante.

Otros ácidos orgánicos, como el ácido málico, ha demostrado capacidad para inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides* en plátano, a través de la inhibición de la respiración fúngica (Kang *et al.*, 2003); y los ácidos sórbico, propionico y decanoico inhibieron el crecimiento de *Penicillium commune* en lichis (Zhang *et al.*, 2005).

1.2.6 Tratamientos físicos en post-cosecha

Los tratamientos físicos han generado un gran interés en los últimos años en el control de enfermedades post-cosecha debido a la ausencia total de residuos en el producto tratado y por su mínimo impacto ambiental. Sin embargo, podrían tener también algunas limitaciones, como el riesgo de efectos adversos en la calidad del producto. Algunos tipos de tratamientos físicos estudiados por su actividad frente a las principales podredumbres post-cosecha son (Usall *et al.*, 2016):

- **Tratamientos con agua caliente:** normalmente se aplican baños o pulverizaciones de agua caliente o aire húmedo o seco. Las inmersiones en agua caliente o la aplicación de aire caliente pueden ser efectivos en el control de enfermedades. Las frutas y hortalizas toleran temperaturas de 40-60 °C durante 20 min. Estas temperaturas pueden controlar el crecimiento de fitopatógenos post-cosecha. En los últimos años, se han estudiado diferentes combinaciones de temperatura y tiempo de exposición que son eficaces para controlar la podredumbre marrón en la fruta de hueso (Usall *et al.*, 2015). Se demostró que la inmersión de agua caliente a 48 °C durante 12 min controlaba el crecimiento de *M. laxa* en melocotones y nectarinas. Un tiempo de tratamiento más corto de 40 s, en agua calentada a 60 °C redujo el desarrollo de infecciones naturales de *Monilinia spp.* en melocotones (Jemric *et al.*, 2011). Karabulut *et al.* (2010) controlaron completamente a *M. fructicola* en nectarinas, melocotones y ciruelas después de sumergirlas durante 60 s

en agua a 60 °C, mientras que la inmersión en agua caliente a 60 °C durante 20 s controló *M. laxa* incluso 48 h después de la inoculación.

- **Calentamiento dieléctrico:** la necesidad de lograr tratamientos térmicos rápidos y eficaces en los últimos años ha aumentado el uso de las radiofrecuencias y el calentamiento por microondas. El calentamiento dieléctrico ha sido ampliamente estudiado como un tratamiento rápido en el control de plagas o como un método de pasteurización y esterilización. Casals *et al.*, (2010b) demostraron la eficacia de un sistema de radiofrecuencias durante 18 min para controlar la podredumbre parda, causada por *Monilnia spp.* en melocotones.
- **Radiación ultravioleta (UV-C):** la luz ultravioleta C ha sido probada como un tratamiento post-cosecha para retrasar el crecimiento de hongos en una gran variedad de frutas y hortalizas frescas. La reducción de las enfermedades post-cosecha de estos productos incitados por UV-C se relaciona con inducir efectos de resistencia, que disminuye al aumentar la madurez de la fruta (D'Hallewin *et al.*, 1999).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Este trabajo se ha desarrollado dentro del proyecto “Conversión a Producción Ecoeficiente de una Explotación de Fruta de Hueso (Fruta EcoPLUS, RTC-2015-3966-2)” el cual tiene como objetivo general el **desarrollo de un sistema de producción de fruta de hueso ecoeficiente** con el que se obtenga una diferenciación clara de calidad del producto. El mayor hándicap en el proceso de transformación de una actividad productiva convencional hacia un proceso más sostenible o ecoeficiente, es el control de patógenos a lo largo de todo el ciclo de vida de la fruta, tanto en precosecha como en post-cosecha (Figura 2.1). Las nuevas técnicas de control de patógenos de fruta de hueso persiguen lograr un impacto positivo en la calidad sensorial, nutricional, así como una vida útil acorde con las exigencias del consumidor y de los mercados. Así, uno de los objetivos técnicos de este proyecto es evaluar los extractos vegetales de *Hypericum perforatum*, *Achillea millefolium*, *Chamaemelum nobile* y *Salvia officinalis* como biopesticidas botánicos para el control de mohos fitopatógenos de fruta de hueso en precosecha y su influencia en el desarrollo de podredumbres en post-cosecha.

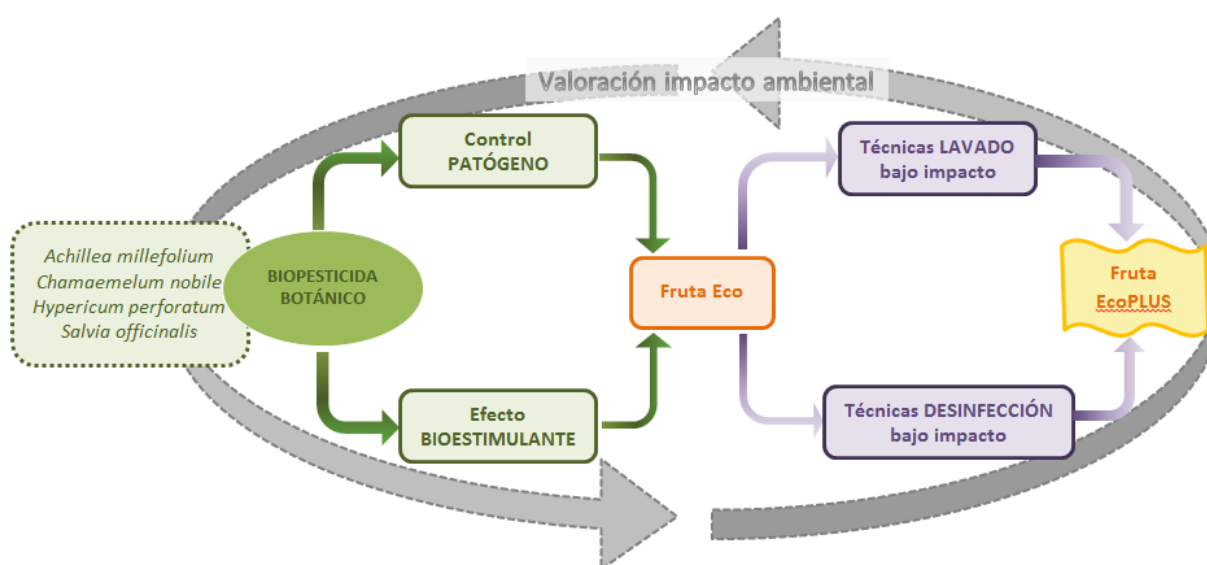


Figura 2.1: Esquema que representa el objetivo de desarrollo de un sistema de producción de fruta de hueso ecoeficiente

El objetivo de este Trabajo Fin de Máster ha sido evaluar la **composición química y la actividad antifúngica frente a *Monilinia* spp. de distintos extractos vegetales obtenidos de *Hypericum perforatum*, *Valeriana officinalis*, *Chamaemelum nobile*, *Achillea millefolium* y *Salvia officinalis*.**

Para la consecución del objetivo general se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

- a. Determinar los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los extractos vegetales.
- b. Detectar y cuantificar los principios activos de los diferentes extractos mediante métodos cromatográficos (Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC)).
- c. Determinar la concentración mínima inhibitoria *in vitro* de los extractos vegetales frente a *M. fructicola* y *M. laxa*, agentes causales de la podredumbre marrón.
- d. Caracterizar microbiológicamente el extracto de salvia aislando e identificando los microorganismos presentes.
- e. Evaluar la influencia de los tratamientos precosecha con extractos vegetales en el desarrollo de podredumbres en post-cosecha
- f. Establecer el efecto de tratamientos biocidas (ácidos peracético y acético) en el desarrollo de podredumbres post-cosecha.

3. MATERIAL Y METODOLOGÍA

3.1. EXTRACTOS VEGETALES

La empresa Lafuente Tomey S.L. (<http://www.lafuentetomey.com/>) proporcionó los extractos comerciales de hipérico, manzanilla, milenrama, salvia y valeriana, por ser los que se utilizan en la explotación. Estos extractos fueron utilizados para su caracterización química y actividad antifúngica.

Por otra parte, la misma empresa proporcionó plantas secas de las mismas especies para a partir de ellas obtener extractos metanólicos y poder comparar su composición con la de los extractos comerciales. Para ello las plantas se molieron en un molino Perten 3100, con un tamiz de 0,8 mm.

3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

La caracterización de los extractos vegetales incluyó la determinación de compuestos fenólicos totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, la capacidad antioxidante total mediante el método 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), y la determinación de principios activos por Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC).

3.2.1 Determinación de compuestos fenólicos

Mediante el método Folin-Ciocalteu se cuantificaron los compuestos fenólicos presentes en los diferentes extractos vegetales. El estudio seguido durante todo este proceso ha sido Singleton *et al.* (1999):

Preparación de las muestras y proceso de extracción: se pesaron 2 g de la planta molida en un tubo Falcon de 50 mL añadiendo 20 mL de metanol:agua (80:20), y 1 mL de extracto comercial en 10 mL del mismo agente de extracción. Tras agitar la muestra vigorosamente en el IKA VORTEX 3 (Aldrich) durante 60 s, ésta se maceró durante 5 min en un baño de ultrasonidos de 6 L 3000513 (Selecta). Finalmente, se centrifugó la muestra a 6000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min en una Centrífuga Rotofix 32A (Hettich), y se añadió el sobrenadante a otro tubo Falcon de 50 mL. En todos los casos se realizaron 3 repeticiones.

Análisis y cuantificación: una vez extraída la muestra se procedió a la cuantificación de compuestos fenólicos. Para ello, se realizó una dilución decimal de las muestras preparando 100 µL de muestra y 900 µL de agua destilada. En el caso de la salvia e hipérico se preparó una

dilución centesimal debido al riesgo de que el resultado final no entrara dentro de la recta patrón.

A continuación se añadieron, en el siguiente orden, 0,125 mL de la muestra diluida, 0,5 mL de agua destilada y 0,125 mL de Folin-Ciocalteu en un tubo de vidrio, agitando posteriormente y dejando reposar durante 3 min. Seguidamente se adicionó 1,25 mL de Na_2CO_3 al 7,5 %, agitando posteriormente la muestra y dejandola reposar de nuevo 3 min. Finalmente, se añadió 1 mL de agua destilada, agitando posteriormente y dejando reposar la muestra en un lugar oscuro durante 1 h, protegida del calor y de la luz. Transcurrido el tiempo necesario, se procedió a la medida de la absorbancia a 750 nm de las muestras y de los patrones en un espectrofotometro Evolution 60S (Thermo Fisher Scientific). Las muestras se realizaron por triplicado.

Para la recta patrón se preparó una solución madre de ácido gálico de 250 mg/L, pesando 0,025 g en un matraz aforado de 100 mL enrasando con metanol:agua (80:20). A partir de esta solución se prepararon diluciones en matraces aforados de 10 mL con concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200 y 250 mg ácido gálico/L

3.2.2 Determinación de la capacidad antioxidante

Mediante el método 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) se determinó la capacidad antioxidante tanto en los extractos comerciales como en los extractos obtenidos en laboratorio, mediante una técnica espectrofotométrica. Los estudios seguidos durante todo este proceso han sido (Llorach *et al.*, 2004; Gil *et al.*, 2000).

Preparación de las muestras y proceso de extracción: se pesó 1 g de planta molida en un tubo Falcon de 50 mL junto a 4 mL de solución metanol:agua (1:1), y 0,5 mL de extracto comercial en 1 mL del mismo agente de extracción. Tras agitar la muestra vigorosamente en el vortex durante 60 s, la muestra se incubó en baño termostático Precisdig (Selecta) durante 30 min a 90 °C. A continuación, la muestra se enfrió en hielo durante 5 min y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. Tras la centrifugación, se añadió el sobrenadante a un tubo Falcon de 15 mL y este se guardó en oscuridad mientras que el residuo obtenido tras la centrifugación fue sometido al mismo proceso de extracción. Finalmente, se combinaron los sobrenadantes en el tubo Falcon de 15 mL y se llevaron a un volumen final de 10 mL con metanol. Este proceso de extracción se realizó por triplicado para cada una de las muestras.

Análisis y cuantificación: se prepararon 5 diluciones decimales de cada una de las

muestras, añadiendo la cantidad necesaria de metanol y muestra. En cada cubeta se añadieron 900 μL de la dilución correspondiente junto a 900 μL de DPPH. Una vez preparadas las diluciones y añadida la solución DPPH se incubaron las muestras tras agitarlas durante 5 s, incluido el patrón en un periodo de tiempo de 2,5 h en oscuridad. Para permitir que se desarrolle totalmente el color. Transcurrido el tiempo necesario, se leyó el espectro a 515 nm, tras realizar el autocero con metanol (blanco). El reactivo DPPH tiene un color morado que vira a amarillo al reaccionar con los compuestos con capacidad antioxidante presentes en las muestras. Se realizó el mismo procedimiento para los patrones.

Para la recta patrón se prepararon diluciones en matraces aforados de 10 mL a partir de una solución madre de Trolox (100 μM) y metanol. Para preparar la solución de trabajo Trolox se cogió 1 mL de solución madre Trolox y se enrasó a 100 mL. A partir de esta solución se prepararon diluciones en matraces aforados de 10 mL a concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 μM .

3.2.3 Determinación de principios activos por cromatografía líquida UPLC

Mediante la técnica cromatográfica Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) se cuantificaron simultáneamente los siguientes compuestos de interés en los extractos vegetales que disponemos: eugenol, cumarina, terpinen-4-ol, geraniol, linalol, timol, limoneno y α -pineno basándonos en los estudios de Drugrand *et al.* (2013); Pandey *et al.* (2015) y Nováková *et al.* (2010), este último fue ligeramente modificado con la propuesta de Porel *et al.* (2014) y Menziani *et al.* (2015).

Preparación de las muestras y proceso de extracción: se realizó una extracción líquido-líquido con disolventes acuosos (disolución de ácido fórmico al 0,1 %) y orgánicos (acetónitrilo puro) en la misma proporción (1:1). Para ello, se pesaron 4 g de planta molida y se añadieron 10 mL de fase acuosa y 10 mL. de fase orgánica. Tras agitar la muestra durante 5 min en un vortex, la mezcla se macera durante 2 h en un equipo de ultrasonidos (Nováková *et al.*, 2010). Finalmente, se centrifugó la muestra a 6000 rpm durante 20 min y se filtró el sobrenadante a través de un filtro de jeringa poliéster (PET) de 0,20 μm . antes de proceder a la medida cromatográfica. Se realizó el mismo procedimiento para los extractos comerciales.

Preparación de los estándares: las disoluciones madres o stock de compuestos de estudio se prepararon en metanol a una concentración determinada. Estas disoluciones se combinaron en

una disolución de trabajo o mix (con una dilución decimal respecto a las disoluciones madres) y se diluyó aún más obteniéndose estándares con concentraciones entre 10 y 200 µg/mL.

Análisis cromatográfico: para la determinación y cuantificación de los compuestos se utilizó un cromatógrafo ACQUITY UPLC H-Class System (Waters, Milford, USA), acoplado a un detector de diodos (PDA), con una columna ACQUITY UPLC BEH C18 (fase reversa, 1,7 µm, 2,5 x 100 mm). La temperatura del horno fue de 30 °C. Se empleó un método en gradiente con dos fases móviles: disolución acuosa 0,1 % de ácido fórmico y acetonitrilo puro como fase acuosa y fase orgánica. El flujo se mantuvo constante a 0,2 mL/min durante 25 min y la detección del PDA se realizó a 210 nm.

3.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

La actividad antimicrobiana *in vitro* consistió en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos vegetales comerciales correspondientes a salvia, valeriana, manzanilla e hipérico frente a las dos especies de mohos responsables de la podredumbre marrón en frutas de hueso: *Monilinia fructicola* y *M. laxa*. Este ensayo se llevó a cabo mediante la técnica del botón fúngico.

Esta técnica se utiliza en mohos con una ratio de crecimiento lento como es nuestro caso para *Monilinia* spp. Para ello, a partir de una placa de agar Patata Dextrosa (PDA, Merck, Darmstadt, Alemania) inoculada con el moho a testar e incubada 10 días a 25 °C se extrae con la ayuda de pinzas y bisturí estéril un cuadrado de micelio fértil de aproximadamente 6 x 6 mm (anchura x altura). Este botón se coloca en el centro de una placa de PDA previamente enriquecido (compuesto antimicrobiano formando parte del agar) con distintas concentraciones de los extractos vegetales. De esta manera tras una incubación de 7 días a 25 °C se puede medir el tamaño del diámetro fúngico y se compara con el de las placas control (sin presencia de extracto vegetal).

Las concentraciones testadas se expresaron en base al porcentaje de extracto presente en el agar enriquecido y fueron: 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,2, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 10 y 20 %.

3.4 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL EXTRACTO DE SALVIA Y ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS.

Para la caracterización microbiológica del extracto de salvia se ha efectuado en primer lugar un recuento de bacterias y levaduras, las cuales se seleccionaron y aislaron por su distinta morfología a partir de placas de recuento. Una vez aislados dichos microorganismos, se procedió a determinar su actividad como agentes de biocontrol frente a *M. fructicola* y aquellos que presentaron alguna actividad fueron identificados mediante técnicas moleculares.

3.4.1 Caracterización microbiológica del extracto de salvia

3.4.1.1 Recuento y aislamiento de bacterias y levaduras

Se realizó un recuento microbiológico del extracto de salvia con el objetivo de identificar y aislar posibles bacterias y levaduras antagonistas a *M. fructicola*. Para el recuento de aerobios mesófilos totales 100 mL del extracto y sus diluciones decimales fueron sembradas por extensión en superficie en agar triptona soja (TSA, Merck) e incubadas a 30 °C durante 3 días. Para las levaduras el medio de cultivo empleado fue el Dicloran Rosa-Bengala Cloranfenicol (DRBC, Merck) y la incubación se realizó a 25 °C durante 5 días. El ensayo se realizó por cuadruplicado.

Transcurrido el periodo de incubación, se realizó el recuento seleccionando aquellas placas con 15-150 colonias.

Posteriormente, se procedió a seleccionar aquellas colonias con diferente morfología. Las bacterias se aislaron en agar TSA y las levaduras en agar DRBC, mediante el método de siembra para aislamiento por agotamiento. Estos microorganismos fueron posteriormente evaluados para determinar su actividad antifúngica frente a *M. fructicola*.

3.4.1.2 Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de los microorganismos aislados del extracto de salvia

Estas pruebas se llevaron a cabo mediante la técnica de los tres puntos equidistantes. En ella una solución de esporas del moho se siembra en la superficie del agar donde posteriormente en 3 puntos equidistantes se inoculan mediante un pincho de siembra los microorganismos a testar como agentes de biocontrol. Tras el periodo de incubación se determina el halo de inhibición del crecimiento fúngico creado alrededor de las colonias.

3.4.1.2.1. Solución de esporas de *M. fructicola*

Las soluciones de esporas de *M. fructicola* se obtuvieron a partir de placas de agar PDA incubadas a 25 °C durante 10 días. Posteriormente se añadieron a la placa 9 mL de agua destilada estéril, con un 0,05 % de Tween 80 y se raspó la superficie con un asa de siembra esterilizada para separar el micelio y las esporas de su superficie. El contenido de la placa se filtró a través de 4 capas de gasa estéril y el número de esporas se ajustó a 10^4 esporas mL⁻¹ tras realizar un recuento microscópico directo y posterior dilución.

3.4.1.2.2. Microorganismos del extracto de salvia

Las bacterias se sembraron por agotamiento en agar TSA y las levaduras en agar extracto de malta (MEA, Merck) y se incubaron a 30 °C durante 1 día y a 25 °C durante 3 días, respectivamente.

3.4.1.2.3. Técnica de detección de la actividad antifúngica

Para realizar este ensayo se empleó la técnica de los tres puntos equidistantes. Para ello en la superficie de placas de agar PDA se sembraron 100 µL de una solución de esporas de *M. fructicola* (10^4 esporas mL⁻¹). Sobre esta siembra se procedió a depositar mediante un pincho de siembra tres inóculos del microorganismo a testar de manera equidistante. Las placas se incubaron a 25 °C durante 7 días, tiempo tras el cual se procedió a la medida de los halos de inhibición generados alrededor de los microorganismos antagonistas. Este ensayo se realizó por duplicado.

3.4.2 Identificación de posibles agentes de biocontrol

Los ácidos nucleicos son macromoléculas comunes a todos los seres vivos que van cambiando con el tiempo. Por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares que sirven para apreciar la escala evolutiva. Asumiendo que los cambios se producen al azar y que aumentan con el tiempo de manera lineal, las diferencias en la secuencia de los nucleótidos son muy útiles para establecer las relaciones filogenéticas entre los seres vivos, creando un marco apropiado para su clasificación e identificación. La identificación se basa fundamentalmente en el análisis mediante secuenciación de una o dos regiones del DNA ribosómico. En el caso de las bacterias la secuenciación del rDNA 16S constituye un método rápido y eficaz de identificación. En el caso de las levaduras, la secuenciación del dominio D1/D2 de la subunidad grande del gen

ribosomal rDNA 26S y/o de la región ITS (espacios intergénicos ITS1 e ITS2 que incluye el gen 5,8S rRNA). Los pasos a seguir para la identificación de nuestras cepas fueron:

- Selección de las cepas: la bacteria y levadura seleccionadas para su caracterización fueron aisladas tras demostrar que ambas tenían actividad antifúngica.
- Extracción DNA (Método PrepMan): la extracción del DNA de la bacteria y la levadura se realizó mediante el método PrepMan, para ello se seleccionó una colonia aislada cuyo tamaño oscilaba entre 1-2 mm. Se suspendió en 100 µL de solución PrepMan y se agitó en vórtex durante 30 segundos. En el caso de la levadura, se partió de un pellet procedente de la centrifugación (full speed) de 2 mL de medio de cultivo. Posteriormente, se incubó en un termobloc a 100°C durante 10 minutos, tras esto se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó durante 3 minutos a 13000 rpm. Finalmente, se transfirieron 50 µL del sobrenadante a un nuevo tubo y se midió la concentración y el grado de pureza. Se conservó a 4°C hasta su utilización.
- Cuantificación del DNA obtenido en nanodrop: este equipo permite realizar medidas de espectrofotometría en un amplio rango de longitudes de onda (220-750 nm) con gran exactitud y reproducibilidad.
- Amplificación del DNA mediante PCR (Polymerase Chain Reaction): con el fin de obtener la cantidad suficiente de DNA para secuenciar la región específica de la bacteria y la levadura a identificar, se preparó la mezcla de reacción especificada en la Tabla 3.1. Se partió de 2.5 µL de DNA (muestra obtenida en el paso anterior). El programa de temperaturas en el termociclador fue el siguiente: se comenzó con un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos. La amplificación se llevó a cabo durante 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94 °C durante 60 segundos, una temperatura de alineamiento de 55 °C durante 30 segundos y una extensión a 72 °C durante 60 segundos. La etapa de extensión final se realizó durante 1 ciclo de 1 minuto a 72 °C.
- Los primers utilizados en el caso de la secuenciación del rDNA 16S bacteriano fueron 8F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') como primer forward y 1492R (5' CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT 3') como primer reverse. En el caso del dominio D1/D2 de la subunidad grande del gen ribosomal rDNA 26S de la levadura, se utilizó como primer forward NL1 (5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3') y como primer reverse

NL4 (5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3').

Tabla 3.1. Mezcla de PCR para amplificación del DNA purificado

Reactivo	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer	1x	2,5
MgCl₂	2 mM	
dNTPs	0,2 mM	2
Primer Forward	0,5 μM	1
Primer Reverse	0,5 μM	1
Taq Polimerasa	0,025 units/μL	0,125
Agua mq esterilizada		15,9
Volumen total		25

- Detección de DNA por electroforesis de agarosa: el DNA amplificado se analizó por electroforesis de agarosa al 2% en tampón TBE al que se le añadieron 6 μL de SYBER SAFE. Las bandas de DNA se separan según su tamaño gracias a la aplicación de 100 V durante 90 minutos. Las bandas de DNA separadas en el gel se visualizaron mediante fluorescencia que se asocia con DNA y exposición de la luz UV. Los resultados se analizaron en la imagen tomada del gel mediante la comparación de las bandas con las del patrón de peso molecular y un control.
- Purificación de los productos de PCR: para obtener DNA con calidad suficiente para su secuenciación, es recomendable eliminar subproductos de la reacción de PCR (como primers y dNTPs) a través de una etapa de purificación. Para ello, se mezclaron 5 μL del producto de PCR con 2 μL del reactivo ExoSAP (si interesa purificar mayor cantidad de producto puro, basta con ajustar la cantidad del reactivo ExoSAP). La mezcla resultante se incubó 15 minutos a 37 °C y sucesivamente 15 minutos a 80 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente, de esta manera la muestra está lista para enviar a secuenciar. Puede comprobarse su pureza midiendo en un nanodrop. Para la obtención de la secuencia se colocarán 10 μL del producto puro a una concentración de 20 ng/μL junto con 3 μL de primer forward a una concentración de 10 pM. Esta muestra fue la que se envió al laboratorio STABvida (<http://www.stabvida.com/es/>) a secuenciar.
- Análisis de la secuencia: una vez recibidos los ficheros con los datos de secuenciación, la última etapa fue la comparación de la secuencia del rDNA 16S y del dominio D1/D2 de la subunidad grande del gen ribosomal rDNA 26S, con las depositadas en las bases de

datos. Para la levadura se consultó la base de datos Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI (National Center for Biotechnology) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> y para la bacteria la base EZBiocloud (Seoul National University and ChunLab, Inc.) (<http://www.ezbiocloud.net/ezgenome>). Para el manejo de los ficheros enviados desde el laboratorio de secuenciación se utilizó el programa MEGA 7 (<http://www.megasoftware.net/>).

3.5 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VIVO*

En este estudio se emplearon melocotones cv. Miraflores procedentes de Lafuente Tomey, cultivados en “Finca Valleluz” (Ricla, Zaragoza, España) y recolectados el 27 de agosto del 2016. La mitad de estos frutos procedió de árboles que habían sido tratados con extractos vegetales de salvia, hipérico y manzanilla durante su cultivo, mientras que la otra mitad no recibió ningún tratamiento precosecha con los extractos vegetales.

A partir de estos frutos se analizó una actividad antimicrobiana *in vivo*, que se complementó con una caracterización del producto para determinar la influencia de los tratamientos aplicados en campo en la calidad de los frutos. Los frutos fueron aportados por los socios del proyecto EcoPlus, correspondientes al siguiente muestreo (Figura 3.1):

LOTE	SUBLOTE
Árboles sin tratamiento de extractos en campo	Sin aplicación de salvia post-cosecha
	Con aplicación de salvia post-cosecha
Árboles con tratamiento de extractos en campo	Sin aplicación de salvia post-cosecha
	Con aplicación de salvia post-cosecha

Figura 3.1. Lotes y sublotes de melocotones Miraflores tratados y no tratados con extractos vegetales en campo y en post-cosecha

Para la caracterización de los frutos se midieron parámetros físico-químicos y fisiológicos:

- **Físico-químicos:** color, firmeza, sólidos solubles totales (SST) y acidez
- **Fisiológicos:** actividad respiratoria y producción de etileno

Color: el color de la fruta es una de las características básicas de calidad, y por lo tanto de su valor en el mercado. La medida instrumental de color se realizó utilizando un espectrofotómetro CM 700 (Konica Minolta).

En cada fruto se realizaron tres medidas de la piel del fruto, y tras calcular el promedio, el colorímetro nos da el valor de las diferentes coordenadas del color de la piel: L^* , a^* , b^* , C, h. y las mediciones de la reflectancia espectral (Figura 3.2). Siempre medido con la fuente de iluminación D65 correspondiente a luz diurna, y el observador de 10° de campo visual adecuado al tamaño del fruto.

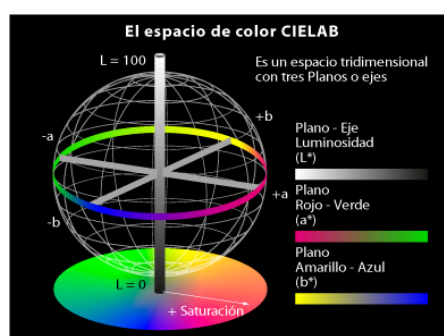


Figura 3.2. Representación del espacio de color CIELAB.

Firmeza: las medidas instrumentales de textura se llevaron a cabo mediante un texturómetro TA-XT Plus (Stable Micro Systems, Goaldming, England) dotado de una célula de carga de 25 kg y otra de 5 kg, con el que se realizarán ensayos de penetración sobre el fruto entero. Para ello se empleó una sonda cilíndrica de aluminio de 2 mm. Además se cuenta con un detector de envolvente acústica con el que podremos determinar instrumentalmente la crocantez del fruto y otros parámetros relacionados.

Sólidos solubles totales (SST): para esta determinación se siguió la técnica descrita en los Métodos Oficiales de Análisis de Zumos de Frutas (AOAC-1984; método nº8. Fédération International des Producteurs de Jus de Fruits, 1962). La medida se realizó sobre una gota de zumo de melocotón y se llevó a cabo en un refractómetro digital de la marca ATAGO, modelo DBX 55, con corrector automático de temperatura (los resultados se expresan en °Brix a 20 °C).

Acidez: el contenido total en ácidos se determinó por valoración con una solución de hidróxido sódico por el método potenciométrico (Official Methods of Analysis, AOAC, 1990). El análisis se realizó por triplicado para cada uno de los lotes por el siguiente procedimiento: 10 mL de zumo se diluyen hasta 60 mL con agua destilada, posteriormente se introduce el electrodo

del pHmetro y se valora con agitación, con hidróxido sódico 0.1N hasta alcanzar un pH de 8.1. Para ello se utilizará un titulador automático CRISON, modelo Compact. La acidez se expresa como g de ácido málico/L de zumo, ya que es éste el ácido mayoritario del melocotón.

Actividad respiratoria y producción de etileno: para la determinación de la actividad respiratoria se empleó un sistema cerrado. Para ello se colocaron los frutos, aproximadamente 700 g, en el interior de recipientes herméticos de 1,5 L y se determinó la concentración de los gases en el espacio de cabeza después de 3 horas a 20 °C. Se tomaron alícuotas de gas a través de un septum y las muestras se analizaron utilizando un analizador automático de gases PBI (Dansensor; Barcelona, España) que nos permite obtener una medida inmediata del % de O₂ y CO₂ existente en el interior de los frascos de medida. Se realizaron 3 réplicas por cada tipo de fruta expresándose los resultados en mL/Kg·h.

El método empleado para la determinación de la producción de etileno fue también el del sistema cerrado, utilizándose los mismos frascos de la actividad respiratoria. La extracción de las muestras se realizó a través de un septum mediante una jeringa Hamilton 1001RN Gastight especial para gases. La muestra (1 mL) se extrajo del espacio de cabeza de los frascos transcurridas aproximadamente 3 horas. La cuantificación del etileno se llevó a cabo al mediante un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 4890 (Palo Alto, USA) dotado de un detector de ionización de llama con columna Hewlett Packard 19001A-QSO.

El tiempo de análisis fue de 5 minutos en condiciones isotermas, con el horno a 50 °C, el detector a 200 °C y el inyector a 50 °C, empleándose N₂ como gas portador. En estas condiciones el tiempo de retención del etileno fue 2,4 minutos. Se realizaron 3 réplicas por cada tipo de fruta expresándose los resultados en µL/Kg·h.

3.5.1 Evaluación de podredumbres en melocotones Miraflores

La mitad de estos frutos procedió de árboles que habían sido tratados con extractos vegetales de salvia, hipérico y manzanilla durante su cultivo (estudio A) mientras que la otra mitad no recibió ningún tratamiento precosecha con los extractos vegetales (Estudio B) (Figura 3.3). Estos dos lotes fueron divididos en 9 sub-lotes y tratados en post-cosecha con extracto de salvia por pulverización, con los biocidas Sanoxol 80 y Tsunami® 100 a dos dosis (260 y 520 ppm) tanto por pulverización como por inmersión (Figura 3.3).

El producto comercial **Tsunami®100** (Ecolab) es un producto desinfectante compuesto

por un 15,2 % de ácido peracético en medio acuoso. Es un líquido transparente sin capacidad espumante y con un fuerte olor característico a ácido acético. Es activo a un amplio rango de pH y proporciona baja reactividad en suelos y materia orgánica. La dosis adecuada que se debe aplicar se encuentra en un rango de 36-575 ppm del producto total, y aproximadamente de 5-80 ppm de ácido peracético. El tratamiento se puede aplicar por pulverización o inmersión. En nuestro caso se testaron dos dosis: 260 y 520 ppm aplicadas por inmersión y por pulverización.

El biocida **Sanoxol 80** (Adybac, Santa Coloma de Cervelló, Barcelona) es un producto diseñado para la higienización de frutas, verduras y hortalizas, compuesto por ácido acético en medio acuoso y exento de cloro. La dosis indicada comprende una solución acuosa al 0,5 % (50 mL/10 L de agua). En nuestro caso se testaron dos dosis: 0,5 y 1 % aplicadas por inmersión y por pulverización.

Las dosis empleadas en este ensayo habían sido previamente testadas por el grupo de investigación “Alimentos de Origen Vegetal” y ninguna de ellas producía efectos fitotóxicos en melocotón. Se realizaron dos estudios (Figura 3.3):

		Post-cosecha									
		Salvia	Acético ¹				Peracético ²				
			Pulverización	Pulverización (5'')		Inmersión (3')		Pulverización (5'')		Inmersión (3')	
				0,5 %	1%	0,5 %	1%	260 ppm	520 ppm	260 ppm	520 ppm
Precosecha	Árboles CON tratamiento de extractos	Estudio A									
	Árboles SIN tratamiento de extractos	Estudio B									

¹ Producto comercial para aplicar ácido acético: Sanoxol®80

² Producto comercial para aplicar ácido peracético: Tsunami®100

Figura 3.3. Estudios realizados para determinar la eficacia de diferentes tratamientos post-cosecha frente a la aparición de podredumbres en melocotones Miraflores.

Además, se consideraron las condiciones reales de trabajo de las empresas para los tratamientos de post-cosecha, los cuales podían ser mediante pulverización durante 5 segundos o inmersión durante 3 minutos. Los frutos así tratados fueron dispuestos a 20 °C y 85 % de humedad relativa y diariamente a partir de los 5 días se monitorizó la aparición de

podredumbres.

Una vez realizada la revisión de podredumbres en los días mencionados anteriormente, se analizaron los datos llevando a cabo dos tipos de estudios:

- **Estudio A:** determinar si sólo con tratamiento post-cosecha a base de extracto es suficiente para prevenir la aparición de podredumbres.
- **Estudio B:** estudiar el efecto combinado de tratamientos en campo a base de extractos más el tratamiento en post-cosecha a base de extracto de salvia mejoran la prevención o resistencia a la aparición de podredumbres.

Para llevar a cabo la comparación entre tratamientos para obtener fruta libre de síntomas de podredumbre se utilizó el risk ratio (RR, riesgo relativo). RR es una medida de asociación entre la exposición a un factor particular y el riesgo de un determinado resultado. Un término equivalente para RR que se utiliza a veces en epidemiología es la razón de incidencia acumulada, que puede calcularse como sigue: RR es igual al riesgo entre los sujetos expuestos dividido por el riesgo entre sujetos no expuestos (Sistrom *et al.*, 2004).

El RR, aplicado al objetivo de este proyecto, se define como la estimación de la causa más probable de tener frutos sanos debido al tratamiento con extractos vegetales respecto al tratamiento con desinfectantes comerciales. Para llevar a cabo dicha estimación se utilizan tablas de contingencia de 2 x 2 como la siguiente (Figura 3.4):

TRATAMIENTO POST-COSECHA	FRUTOS SANOS	FRUTOS INFECTADOS
Salvia	a	b
Ácidos orgánicos	c	d

Figura 3.4. Tabla 2 x 2 representando dos variables, el estado del fruto (sano o infectado) y los diferentes tratamientos post-cosecha a comparar.

$$\text{Riesgo Relativo (RR)} = \frac{\frac{a}{a+b}}{\frac{c}{c+d}}$$

El cociente del RR toma valores entre 0 e infinito interpretando que, cuando RR es mayor que 1, el riesgo de enfermedad aumenta cuando el factor de riesgo está presente. Cuando RR es menor que 1, el riesgo de enfermedad disminuye cuando el factor de riesgo está presente.

En este último caso, el factor se describe más correctamente como un factor de protección (Sistrom *et al.*, 2004). En el caso de nuestro proyecto se interpreta como:

- $RR = 1$: no hay asociación entre el factor (fruta sana) y el suceso (tipo de tratamiento).
- $RR > 1$: hay asociación positiva, es decir, la presencia del factor (fruta sana) se asocia a una mayor frecuencia de que el evento suceda (efecto del extracto vegetal $>$ efecto del desinfectante).
- $RR < 1$: hay asociación negativa, es decir, la presencia del factor (fruta sana) se asocia a una menor frecuencia de que el evento suceda (efecto del extracto vegetal $<$ efecto del desinfectante).

3.6 ANALISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se compararon estadísticamente mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA de una vía) combinado con el test de Turkey de rango múltiple con un nivel de significación del 0,05. En el análisis de datos se utilizó el programa estadístico *SPSS* versión 19.0.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para caracterizar la composición química de los diferentes extractos, se determinaron los compuestos fenólicos, la capacidad antioxidante y los principios activos presentes en estos.

4.1.1 Determinación de los compuestos fenólicos

El contenido de fenoles totales fue expresado en mg de ácido gálico/100 mL. Los resultados, tanto para los extractos comerciales como para aquellos obtenidos en laboratorio a partir de plantas secas se muestran en la Figura 4.1.

Entre los extractos comerciales los que mostraron una mayor cantidad de compuestos fenólicos fueron el extracto de salvia (31,0 mg ac. gálico/100 mL), manzanilla (30,1 mg ac. gálico/100 mL) e hipérico (29,3 mg ac. gálico/100 mL).

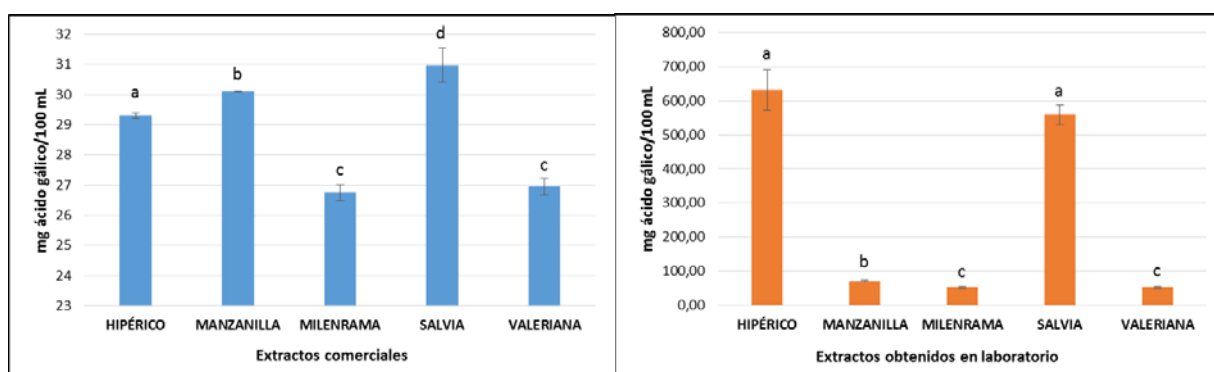


Figura 4.1. Compuestos fenólicos totales de los extractos comerciales (izqda.) y obtenidos en laboratorio (drcha.). Las columnas con letras diferentes son estadísticamente diferentes acorde con el test Turkey ($P < 0,05$).

En los extractos que fueron obtenidos en laboratorio, empleando una mezcla de metanol:agua (80:20) como medio de extracción se detecta un considerable aumento de la cantidad de compuestos fenólicos. En este caso el extracto de salvia y de hipérico vuelven a ser los que contienen una mayor concentración (559,3 y 632,4 mg ac. gálico/100 mL, respectivamente), mientras que los demás extractos (manzanilla, milenrama y valeriana) presentan valores menores a 100 mg ac. gálico/100 mL.

Estas diferencias tan significativas en cuanto al contenido en fenoles entre los dos tipos de extractos (comerciales y obtenidos en laboratorio) pueden deberse al solvente empleado en la extracción, que en el caso de los extractos comerciales pensamos que es agua sin adición de ningún otro solvente más polar y por tanto con una mayor capacidad de extracción.

Albayrak *et al.*, (2013) examinaron el contenido de fenoles totales de los extractos metanólicos de seis plantas (*Mentha spicata*, *Thymus*, bálsamo de limón, *Ocimum basilicum*, *Rosemanirus officinalis* y *Salvia officinalis*) y encontraron valores bastantes más elevados que los nuestros: extracto de salvia (111.300 mg ácido gálico/L), extracto del bálsamo de limón (93.400 mg ácido gálico/L) y extracto de albahaca (19.070 mg ácido gálico/L). Otro estudio, Djeridane *et al.* (2006), evaluó una variedad de 11 plantas medicinales, cuya evaluación está relacionada con el contenido fenólico total, empleando etanol al 70% como agente de extracción. El contenido fenólico total, analizado, utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, de las muestras varió de 3,13 a 32,32 mg ac. gálico/g de peso seco.

4.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante total fue expresada en mg Trolox/100 mL. Como puede verse en la Figura 4.2, la mayor capacidad antioxidante dentro de los extractos comerciales vuelve a ser para el extracto de salvia (16,5 mg Trolox/100 mL) con valores significativamente mayores que el resto de extractos que no superan los 10 mg ac. Trolox/100 mL. De nuevo también los extractos obtenidos en laboratorio, amostraron un significativo mayor contenido, en torno a 10 veces más, que los comerciales. Destaca entre ellos el extracto de salvia con 1.417 mg Trolox/100 mL.

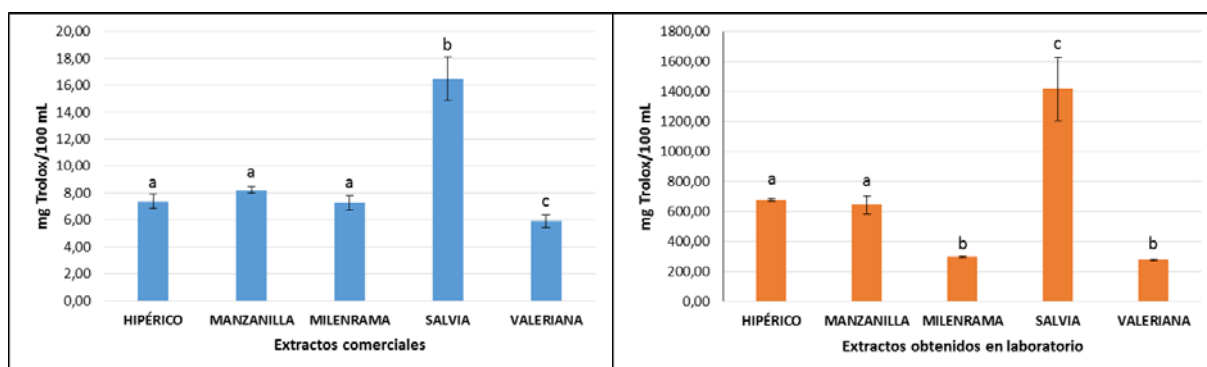


Figura 4.2. Capacidad antioxidante de los extractos comerciales (izqda.) y obtenidos en laboratorio (drcha.). Las columnas con letras diferentes son estadísticamente diferentes acorde con el test Turkey ($P < 0,05$).

En un estudio, Vaydia *et al.* (2014), es examinó la capacidad antioxidante de 16 especies de *Scutellaria* utilizando metanol al 100% como agente de extracción a partir de hojas frescas y secadas al aire. Extractos de hojas secas de *S. ocmulgee* registraron 2480,93 μmol Trolox /g y un mayor contenido en polifenoles de 732,41 mg ac. gálico/g.

4.1.3 Determinación de principios activos por cromatografía líquida UPLC

Los compuestos determinados por UPLC incluyeron geraniol, linalool, timol, limoneno, α -pineno, eugenol, terpinen-4-ol y cumarina. Estos compuestos se seleccionaron en base a la literatura científica consultada (*Phytobotanical and ethnobotanical databases del Agricultural Research Service* del USDA) ya que eran los responsables de las propiedades insecticidas, fungicidas o bactericidas de los extractos vegetales. Este ensayo se basó principalmente en el estudio de Nováková *et al.* (2010), ligeramente modificado con el estudio de Porel *et al.* (2014) y Menziani *et al.* (2015).

Las gráficas de calibración, representadas con cinco concentraciones diferentes de cada componente, mediante regresión lineal tienen un coeficiente de regresión $R^2 \geq 0,996$. El límite de detección (LOD) fue estimado para todos los componentes y fue $\geq 10 \mu\text{g/mL}$.

Al analizar los 4 extractos comerciales no se detectó presencia de ninguno de los 8 compuestos estudiados. Este hecho puede deberse a varias causas o a su combinación:

1. El medio de extracción empleado, probablemente agua, no consigue separar estos compuestos de su matriz vegetal. El geraniol es un alcohol terpénico encontrado en los aceites esenciales de varias plantas aromáticas, entre ellas el geranio (90%), de color amarillo, insoluble en agua, pero soluble en la mayoría de solventes orgánicos, como el diclorometano (Chen *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2009; López and Gómez, 2000). El linalool es un alcohol terpenico encontrado en aceites esenciales en más de 200 tipos de plantas (lavanda, jazmín, cilantro, etc.). Al igual que el geraniol, es insoluble en agua y soluble en diclorometano (Bueno-Duarte *et al.*, 2015; López and Gómez, 2000). El timol es un derivado fenólico que se encuentra presente en el aceite esencial del tomillo y orégano, y es soluble en cloroformo (Garcia Garcia *et al.*, 2008). El limoneno es un hidrocarburo terpénico que se encuentra en el aceite esencial de cítricos como el limón o plantas como la menta cuyo agente de extracción es el cloroformo, entre otros solventes orgánicos (Martinez *et al.*, 1996). El alfa-pineno es un hidrocarburo terpénico más abundante después del limoneno y el principal componente del aceite esencial de trementina, soluble también en solventes como cloroformo o diclorometano (Rojas *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 1996). El eugenol es un derivado fenólico aromático de consistencia líquida y aceitosa y de color amarillo, que constituye el componente principal de los aceites esenciales de la planta de clavo (*Eugenia caryophyllata Thunb*)

difícilmente soluble en agua y soluble en solventes orgánicos, al igual que los terpenos (Garde, 2013; Rojo del Olmo *et al.*, 2009). El terpinen-4-ol es otro alcohol terpénico, componente principal del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* (árbol de té). Como el resto de alcoholes terpénicos es soluble en los solventes orgánicos anteriormente mencionados (Hart *et al.*, 2000). La cumarina es un derivado fenólico que se encuentra como constituyente en el aceite de *Citrus bergamia* (bergamota). Este compuesto se extrae fácilmente a partir de etanol como solvente orgánico (Perez *et al.*, 2009; Oliveros-Bastidas *et al.*, 2009).

2. Durante su almacenamiento los extractos han sido metabolizados o se han degradado a otros compuestos. Algunos compuestos como el α -pineno y el geraniol pueden sufrir una biotransformación a partir de cepas bacterianas como *Rhodococcus opacus*, un grupo de bacterias Gram positivas que está ampliamente distribuido en suelo y agua, muy conocido por su diversidad metabólica que incluye hidrocarburos, compuestos aromáticos y moléculas grandes como esteroides. Tiene la habilidad de catalizar la hidroxilación y un gran potencial oxidativo. *R. opacus* tiene la capacidad de convertir el geraniol en geranial y ácido geránico, y el α -pineno en verbenol o verbenona (Rojas *et al.*, 2009). En el caso del eugenol, se ha estudiado la capacidad de las bacterias lácticas del vino para metabolizar algunos compuestos fenólicos precursores de vanilina.
3. Los compuestos se encuentran en una concentración inferior al límite de detección del método (LOD = 10 $\mu\text{g/mL}$).

En la Figura 4.3 se detallan los contenidos de los compuestos analizados presentes en los extractos de plantas obtenidos en nuestro laboratorio. En el extracto de salvia se registraron geraniol (17,2 mg/100 mL), linalool (10,8 mg/100 mL), timol (8,5 mg/100 mL), limoneno (24,4 mg/100 mL) y α -pineno (28,8 mg/100 mL), en ausencia de eugenol. En el extracto de milenrama se detectaron eugenol (2,2 mg/100 mL), timol (0,7 mg/100 mL) y α -pineno (2,7 mg/100 mL), en ausencia de geraniol, linalool y limoneno. En el extracto de manzanilla encontramos eugenol (0,8 mg/100 mL) y limoneno (0,7 mg/100 mL), y ausencia de geraniol, linalool, timol, limoneno y α -pineno. En último lugar, en el extracto de hipérico se cuantificaron geraniol (4,1 mg/100 mL), limoneno (1,8 mg/100 mL) y α -pineno (4,5 mg/100 mL), y no detectamos linalool, timol y eugenol. Todos los extractos analizados mostraron ausencia de los compuestos activos terpinen-4-ol y cumarina.

Resumiendo, el extracto de salvia es el que mayor número de principios activos contiene (5) y, además éstos se encuentran en mayor concentración. En segundo lugar se encuentra el hipérico, seguido de la milenrama y de la manzanilla.

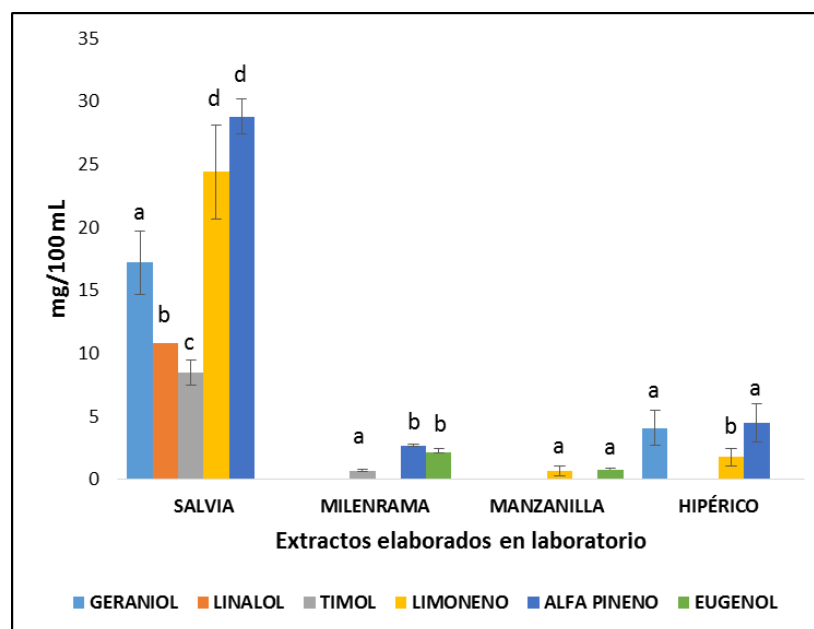


Figura 4.3. Principios activos (mg/100 mL) presentes en los extractos de salvia, milenrama, manzanilla e hipérico obtenidos por maceración de plantas deshidratadas. Las columnas con letras diferentes son estadísticamente diferentes acorde con el test Turkey ($P < 0,05$).

En la figura 4.4 se presentan los cromatogramas obtenidos en los extractos analizados.

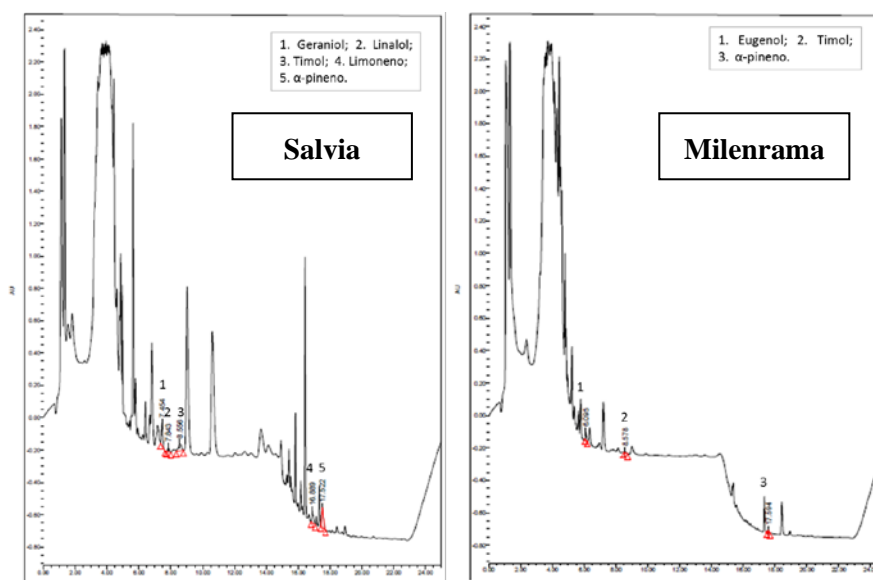


Figura 4.4. Cromatogramas que representan el contenido en principios activos de los extractos obtenidos en laboratorio por maceración de plantas deshidratadas.

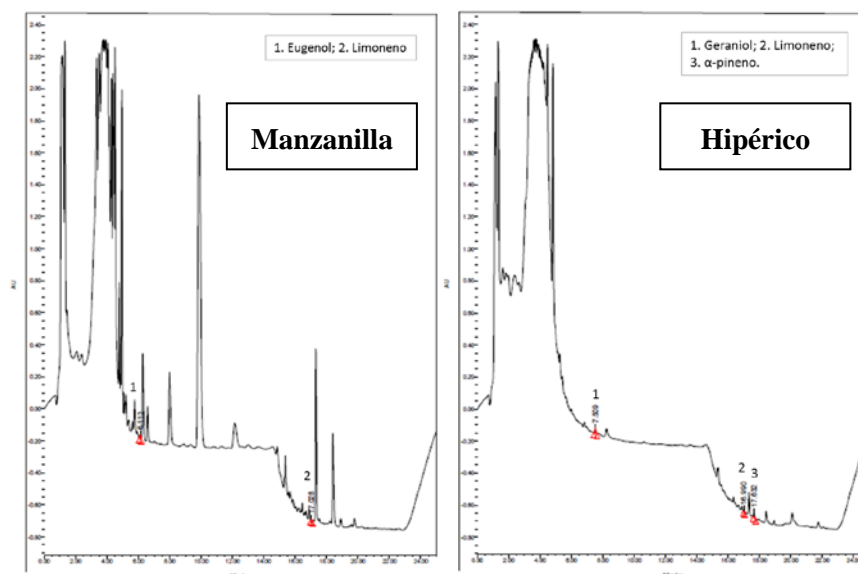


Figura 4.4. (cont.) Cromatogramas que representan el contenido en principios activos de los extractos obtenidos en laboratorio por maceración de plantas deshidratadas.

4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO*

La actividad antifúngica *in vitro* de los extractos vegetales comerciales se determinó en medio sólido empleando agar PDA enriquecido con estos extractos mediante la técnica del botón fúngico donde se mide la inhibición del crecimiento respecto a un control libre de extractos.

En *M. laxa*, los resultados de la CMI mostraron un inicio de la inhibición en el extracto de salvia a una concentración de 0,005-0,2 %, en el hipérico a una concentración del 4 % y en el caso de valeriana y manzanilla al 0,5 %. Mientras que en el caso de *M. fructicola*, los resultados de la CMI mostraron un inicio de inhibición en el extracto de salvia y de valeriana a una concentración del 2 %, en el de manzanilla al 10 % y en el de hipérico al 20 %. Se puede apreciar que *M. laxa* es más sensible a la actividad antifúngica de estos extractos que *M. fructicola* (Tabla 4.1).

Fu *et al.* (2016) que evaluaron el efecto inhibitor del extracto de berberina frente a la podredumbre marrón causada por *M. fructicola* en melocotones, encontraron un aumento en la inhibición de *M. fructicola* (de 34,8-100 %) a medida que aumentaba la concentración del extracto, evitando su crecimiento a una concentración de 45,5 mg/L. Jimenez *et al.* (2015) determinaron la actividad fungicida de los extractos de *Ruta graveolens*, *Nicotiana tabacum* y *Crisanthemum morifolium* contra el moho *Botrytis cinerea*, extraídos a partir de hojas y flores con diferentes solventes de extracción como etanol, hexano y diclorometano. De estos extractos, solo el extracto diclorometánico de las hojas de *R. graveolens* inhibió la germinación de esporas

de *B. cinerea* en un 57,5%, con una concentración mínima inhibitoria de 62,5 µg/mL, siendo este extracto útil en el control de la enfermedad del moho gris.

Tabla 4.1. Porcentaje de inhibición de los extractos vegetales comerciales de salvia, valeriana, manzanilla e hipérico, frente al crecimiento de *M. fructicola* y *M. laxa*.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (%)	% Inhibición	
		<i>Monilinia fructicola</i>	<i>Monilinia laxa</i>
CONTROL	0	-	-
SALVIA	0,005	0	2,7
	0,01	0	2,7
	0,02	0	3,8
	0,04	0	2,9
	0,08	0	3,5
	0,2	0	10
	0,5	- ^a	26
	1	-	40
	1,5	-	70,7
	2	2,6	61,1
	4	15,8	-
	6	28,2	-
	10	56,0	100
	20	80,5	100
HIPÉRICO	0,005	0	0
	0,01	0	0
	0,02	0	0
	0,04	0	0
	0,08	0	0
	0,2	0	0
	0,5	-	-
	1	-	-
	1,5	-	-
	2	0	0
	4	-	55,4
	6	-	68,2
	10	0	70
	20	8,8	77

^a:- no testado

Tabla 4.1. (cont.) Porcentaje de inhibición de los extractos vegetales comerciales de salvia, valeriana, manzanilla e hipérico, frente al crecimiento de *M. fructicola* y *M. laxa*.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (%)	% Inhibición	
		<i>Monilinia fructicola</i>	<i>Monilinia laxa</i>
CONTROL	0	-	-
VALERIANA	0,005	0	0
	0,01	0	0
	0,02	0	0
	0,04	0	0
	0,08	0	0
	0,2	1,8	5,2
	0,5	-	38,7
	1	-	38,7
	1,5	-	53
	2	12,2	41
	4	17,9	-
	6	33,7	-
	10	53,8	76,6
	20	69	100
MANZANILLA	0,005	0	0
	0,01	0	0
	0,02	0	0
	0,04	0	0
	0,08	0	0
	0,2	0	0
	0,5	-	23,98
	1	-	35,67
	1,5	-	55,03
	2	0	73,01
	4	-	-
	6	-	-
	10	9,65	100
	20	31,74	100

^a:- no testado

4.3 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL EXTRACTO DE SALVIA

El extracto de salvia fue el extracto comercial con un mayor contenido en fenoles y capacidad antioxidante y que mostró una inhibición del crecimiento fúngico, aunque a concentraciones elevadas, más notable. Por ello, y presuponiendo que estos extractos podrían contener algún microorganismo antagonista que contribuyese a los efectos en el control de las enfermedades fúngicas que se les atribuyen, se procedió a: caracterizar la microbiota presente, aislar los microorganismos morfológicamente distintos, estudiar su actividad de biocontrol frente

a *M. fructicola* y *M. laxa* e identificar, mediante técnicas moleculares, aquellos que presentaran algún tipo de actividad.

4.3.1 Recuentos de bacterias y levaduras

Los recuentos de bacterias y levaduras fueron de $2,1 \times 10^5$ y $1,6 \times 10^5$ Unidades formadoras de colonia (UFC)/ mL de extracto (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Recuento de bacterias y levaduras (UFC/mL) en el extracto de salvia

Bacterias	Levaduras
$2,1 \pm 0,9 \times 10^5$	$1,6 \pm 0,5 \times 10^5$

A partir de las placas de TSA y DRBC se aislaron 15 bacterias y 10 levaduras, respectivamente, todas ellas con diferentes caracteres macroscópicos y microscópicos.

4.3.2 Actividad antifúngica *in vitro* de los microorganismos antagonistas

Todos los microorganismos anteriormente aislados fueron testados *in vitro* para determinar su capacidad antagonista frente a *M. fructicola*. Solamente una de las bacterias inoculadas mostró inhibición, con un halo de inhibición de 28 mm (Tabla 4.3). Así mismo, en el caso de las levaduras, solo una mostró inhibición, con un halo de 20,3 mm. Ambas fueron denominadas como bacteria B1 y levadura L2i. En la Figura 4.5 se puede observar el halo de inhibición creado por la bacteria y la levadura.

Tabla 4.3. Diámetro del halo de inhibición frente a *M. fructicola* de una cepa bacteriana y una cepa de levadura aisladas del extracto comercial de salvia

Microorganismo	Halo de inhibición (mm)
Bacteria B1	$28,0 \pm 3,6$
Levadura L2i	$20,3 \pm 0,6$

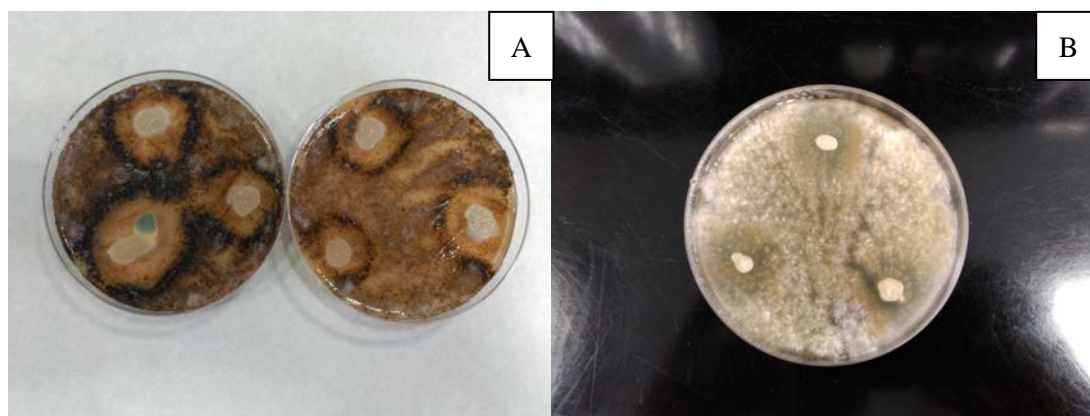


Figura 4.5. Halos de inhibición de *M. fructicola* de la bacteria (A) y levadura (B) aisladas del extracto comercial de salvia

4.3.2.1 Identificación de la bacteria y la levadura con actividad antagonista

Extracción y cuantificación de DNA (Método PrepMan): los resultados obtenidos tras realizar el procedimiento de extracción se muestran en la Tabla 4.4. Puede verse que en todos los casos se consiguen concentraciones suficientes para poder realizar PCR. Además, el control negativo de la extracción nos muestra un valor cercano a 0 que indica que no hay ninguna interferencia que pueda estar co-extrayendo. Respecto a la ratio de pureza 260/280 salvo en el caso del DNA de levadura obtenido de colonia, todos los demás presentan valores cercanos a 1,8 que es el considerado como indicativo de un DNA puro. La ratio 260/230 muestra valores en todos los casos ligeramente inferiores a lo que se considera un DNA libre de otros contaminantes (1,8-2,2). Esto puede resultar importante dependiendo del uso posterior del DNA que hemos extraído, pero en este caso, no va a suponer problema para la amplificación de las regiones de interés.

Tabla 4.4. Resultados de extracción DNA microorganismos a identificar

Muestra	[ng/μL]	Abs 260/280	Abs 260/230
Control negativo de extracción	1,3	0,6	0,1
DNA bacteria	214,4	1,6	0,9
DNA levadura (medio líquido) 1	58,9	1,7	0,4
DNA levadura (colonia) 2	142,6	2,7	0,5

Detección y purificación del DNA amplificado: los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.6. Se puede ver que en todos los casos se produjo amplificación del DNA. Se

comprobó que la longitud del fragmento obtenido correspondiera con el tamaño de la región que amplifican los primers. Así, los primers 8F y 1492R amplifican una región de ~1500 pb y los primers NL1 y NL2 una región ~400-600pb.

Como se observa en la Figura 4.6, las bandas amplificadas de DNA de la bacteria tienen un tamaño aproximado de 1200 pb, y las bandas obtenidas para el DNA de levadura un tamaño aproximado de 500 pb. Estos datos sugieren que se han amplificado las regiones esperadas (rDNA 16S para la bacteria y del dominio D1/D2 de la subunidad grande del gen ribosomal rDNA 26S para la levadura). Además, lo han hecho de una forma selectiva, es decir, sólo vemos una banda por muestra, lo que hace descartar amplificaciones inespecíficas y permite saber que sólo tenemos un producto en cada reacción.

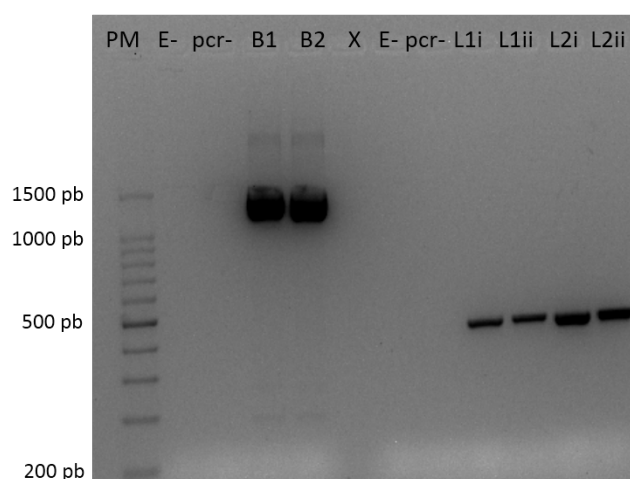


Figura 4.6. Detección del DNA amplificado. De izquierda a derecha: control de peso molecular; control negativo de extracción DNA bacteriano; control negativo de pcr; DNA bacteriano (réplica 1,) DNA bacteriano (réplica 2), pocillo libre, control negativo de extracción DNA levadura, control negativo de pcr, DNA de levadura obtenido en cultivo líquido (réplica 1), DNA de levadura obtenido en cultivo líquido (réplica 2), DNA de levadura obtenido de colonia (réplica 1), DNA de levadura obtenido de colonia (réplica 2).

Tras comprobar que la amplificación había funcionado correctamente, se llevó a cabo el proceso de purificación y se verificó que la concentración y la pureza de las muestras era la requerida para su envío a secuenciación, para ello se utilizó el nanodrop. En la Tabla 4.5 se muestra la concentración y la pureza de las muestras que mejores resultados proporcionaron y fueron las que se enviaron a secuenciar. En todos los casos los valores indicaron la buena calidad del DNA obtenido.

Tabla 4.5. Resultados de concentración y pureza del DNA enviado a secuenciar

Muestra	[ng/μL]	Abs 260/280	Abs 260/230
Bacteria (B1)	405,9	1,89	1,87
Levadura (L2i)	464,3	1,67	1,88

Análisis de la secuencia y búsqueda de candidatos: las secuencias obtenidas se muestran a continuación:

Secuencia obtenida de la bacteria

ctatacntgcnagtcgagcggacagatgggagcttgctccctgatgttagcggcgacgggtgagtaaacgtgggtaacctgcctgtaagactgggataactccggg
 aaaccggggctaataaccggatggtgtttgaaccgcatggtcaaacataaaaggtggcttcggctaccacttacagatggacccgcggcattagctagtgtgagg
 taacggctcaccaaggaacgatgctgacggacgtgagagggtgatcgccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagcagcagtagggaat
 ctccgcaatggacgaaagtctgacggagcaacgccgctgagtgatgaaggttttcggatcgtaaagctctgtttagggaagaacaagtaccgttcgaataggcg
 gtaccttgacggtacctaaccagaaagccacgggtaactacgtgccagcagccgcggttaacgtagggtgcaagcgtgtccggaattattggcgtaaaagggtcgc
 agggcggtttctaagtctgatgtgaaagccccggctcaaccggggagggtcattgaaactggggaactgagtcgagaagaggagagtgaattccacgtgtagc
 gtgaaatgcgtagagatgtggaggaacaccagtggcggaaggcgactctctggtctgtaactgacgctgaggagcgaagcgtggggagcgaacaggattagatacc
 tggtagccacgccgtaaacgatgagtgtgtaagtgtaggggtttccgcccttagtctgacgtaacgcattaagcactccgctggggagtacggtcgcaagactg
 aaactcaaggaattgacggggggccgcacaagcgtggagcatgtggttaattcgaagcaacgcgaagaaccttacnggtcttgacatcctctgacnaccctagag
 ataggagctcccttcgggggcagagtgaacnnngngcatggnnngtcgncagctcgtgtcngagatgttggttaagtcgccncacgagcgcancnttgatctt
 annnncagcatcannngnnntctannnnactgnnnnnacaannngnnnggggatnangtcaaatcatcann

Secuencia obtenida de la levadura

Gggtttgccttagtagcggcagtgaaagcggcaaaagctcaatttgaacgcttcggcgtgttgtaagtaaaagtggtagacgcttttaataagtccttgaacaggcg
 gccatagagggtgtagccccgtattaaattgtctagtgtgctacttttagagcgagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaatagggtgtaaacctcctctaaagctaaat
 tgctgggagaccgatagcgaacaagtacagtgtgaaagatgaaaagcactttgaaaagagagtgaatatgcgtgtgaaattgttgagggggaaggcgatgtagg
 aataagaggctcggtttgaaataattgttttcgggccacgggtcctgagcctgcttcgcacccgtcttaa

Estas secuencias fueron procesadas gracias a la herramienta bioinformática MEGA 7 y a la consulta de diferentes bases de datos.

La secuenciación de 1500 pb de la región del 16S de la bacteria a determinar dio como resultado: ***Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429(T) →97%.**

El género *Bacillus* se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en el ciclo del carbono y el nitrógeno. Son habitantes comunes de aguas frescas y estancadas y son particularmente activos en sedimentos (Cuervo Lozada, 2010). *B. subtilis* posee actividad antimicrobiana actuando como antagonista frente a la especie *M. fructicola*, reduciendo el deterioro que causa este moho en frutas de hueso como el melocotón, la nectarina y el pomelo (Pusey *et al.*, 1984).

Como se muestra en la figura 4.7, existe una homología con la cepa propuesta del 97%. Sin embargo, lo ideal al secuenciar fragmentos de 1500 pb de esta región ribosómica del 16S es obtener un porcentaje del 98% (o mayor) con los candidatos propuestos para poder clasificar a la nueva bacteria con mayor seguridad. En este caso, tenemos varias bacterias candidatas conocidas

con porcentaje de 97% (en el puesto 10 se encuentra FZB42 cepa ampliamente estudiada como potencial agente de biocontrol) lo que podría sugerir que la bacteria problema pueda pertenecer a la familia de las productoras de antibióticos para control biológico.

Tasks	Rank	Name	Strain	Authors	Pairwise Similarity (%)
	1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	KCTC 13429(T)	Rooney et al. 2009	97.58
	2	<i>Bacillus tequilensis</i>	KCTC 13622(T)	Gatson et al. 2006	97.58
	3	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	NCIB 3610(T)	(Ehrenberg 1835) Nakamura et al. 1999	97.50
	4	<i>Bacillus mojavensis</i>	RO-H-1(T)	Roberts et al. 1994	97.43
	5	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	NRRL B-23049(T)	Nakamura et al. 1999	97.43
	6	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	DSM 8802(T)	Delaporte and Sasson 1967	97.43
	7	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	KACC 13105(T)	Madhaiyan et al. 2010	97.28
	8	<i>Bacillus siamensis</i>	KCTC 13613(T)	Sumpavaporn et al. 2010	97.21
	9	<i>Bacillus vallismortis</i>	DV1-F-3(T)	Roberts et al. 1996	97.21
	10	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	FZB42(T)	Boniss et al. 2011	97.13
	11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>amyloliquefaciens</i>	DSM 7(T)	Boniss (ex Fukumoto 1943) Priest et al. 1987	96.99
	12	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 25995(T)	Went et al. 1940	96.69
	13	<i>Bacillus vanillea</i> (Invalid name)	XY18(T)	Chen et al. 2014	96.69
	14	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580(T)	(Weigmann 1896) Chester 1901	95.96

Figura 4.7. Resultados obtenidos tras enfrentar la secuencia obtenida de la bacteria con las existentes en la base de datos EZBioCloud

En el caso de la secuenciación de 600 pb procedentes del dominio D1/D2 de la subunidad grande del gen ribosomal rDNA 26S de la levadura problema dio como resultado: *Magnusiomyces capitatus* cepa NS1 → 99% (Figura 4.8).

Description	Ident	Accession
Magnusiomyces capitatus strain NS1 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	KM924525.1
Magnusiomyces spicifer isolate TR 12.b 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	KP017396.1
Magnusiomyces capitatus partial 28S rRNA gene, strain Kw-230	99%	HG313854.1
Dipodascus capitatus isolate DO-Y22 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	JQ965857.1
Magnusiomyces capitatus strain MGM/KSU6 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	KF459940.1
Dipodascus capitatus isolate DO-Y12 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	JQ965859.1
Magnusiomyces capitatus isolate TR 8.c 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	KP017400.1
Dipodascus capitatus strain T142-NL1 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	KF214445.1
Dipodascus capitatus 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	U40084.1
Magnusiomyces capitatus strain NCCPF 480018 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	KT005309.1
Dipodascus sp. AA-M24 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	JQ965880.1
Magnusiomyces spicifer isolate OP 15.b 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	KP017395.1
Magnusiomyces spicifer isolate OP 11.a 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	KP017394.1
Magnusiomyces capitatus strain NCCPF 480020 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	KT005311.1

Figura 4.8. Resultados obtenidos tras enfrentar la secuencia obtenida de la levadura con las existentes en la base de datos BLAST

M. capitatus es un hongo micelial patógeno predominantemente europeo, con una mayor prevalencia en los países mediterráneos, no exótico, que vive en la tierra y la madera y con frecuencia se puede aislar en la piel y el tracto digestivo de personas sanas (Guerra *et al.*, 2015).

Hay otras con el mismo porcentaje, que las clasifican como *spicifer*, pero al buscar en el Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>), aparece que hasta hace poco no se discriminaba entre *spicifer* y *capitatus* y muchas están clasificadas como *capitatus*. No se ha encontrado específicamente que este tipo de levaduras se puedan utilizar como microorganismos para control biológico. Como se ha comentado en la introducción, habría que confirmar esta información con otro tipo de pruebas que la describieran fenotípicamente.

4.4 INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS CON EXTRACTOS VEGETALES EN LA CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA Y EN LOS PARAMETROS FISIOLÓGICOS DE LOS MELOCOTONES

El objetivo de este ensayo fue determinar si los tratamientos con extractos vegetales aplicados en campo y en central producían alguna variación en los parámetros físico-químicos y fisiológicos de los frutos. Estos parámetros se determinaron a la recepción de los frutos (tiempo inicial) y tras catorce días de almacenamiento a ± 1 °C (tiempo final).

Los resultados mostrados respecto a la acidez, sólidos solubles totales y firmeza se detallan en la Tabla 4.6. En el caso de los sólidos solubles totales, no se aprecian diferencias entre los diferentes sublotes, ocurre lo mismo en la firmeza. Sin embargo, se puede apreciar una diferencia para el caso de la acidez en el lote de fruta sin tratamiento en campo con extractos vegetales, correspondiendo el valor más bajo a la fruta sin tratar con salvia en central.

Según la Norma general del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas (*CODEX STAN 247-2005*), en el caso de los melocotones, los SST deben tener un mínimo de 10,5 °Brix, la acidez se sitúa en torno a los 50-80 meq/L de acidez total valorable y la firmeza recomendada se encuentra en torno a 9-11 N (0'9-1,1 kg) (Lleó Garcia *et al.*, 1999).

Respecto al color, en la Tabla 4.7 sólo se observaron diferencias en el croma (C), correspondiendo el valor más alto a la fruta que llevaba el tratamiento de salvia analizada a los 14 días. Otro parámetro de interés en el índice de color, que aunque no se aprecien diferencias significativas, se observa que tras 14 días de conservación, la fruta con tratamiento de salvia tiene un valor más pequeño, que es consecuencia de un aumento del color amarillo (un b* mayor)

Tabla 4.6. Parámetros físico-químicos (acidez, SST, firmeza y color) en melocotones cv. Miraflores tratados o no tratados con extractos vegetales en precosecha y tratados o no tratados con extracto de salvia en post-cosecha

LOTE	SUBLOTE	Días a ± 1 °C	ACIDEZ (g ac. málico/L)	SST (°Brix)	FIRMEZA (kg)
Arboles sin tratamiento de extractos en precosecha	Sin aplicación de salvia post-cosecha	0	6,68 \pm 0,23	12,80 \pm 0,67	1,38 \pm 0,54
		14	5,55 \pm 0,43	12,93 \pm 0,42	0,94 \pm 0,57
	Con aplicación de salvia post-cosecha	14	6,26 \pm 0,35	12,87 \pm 0,25	1,12 \pm 0,51
Arboles con tratamiento de extractos en precosecha	Sin aplicación de salvia post-cosecha	0	6,31 \pm 0,88	12,55 \pm 0,42	1,19 \pm 0,57
		14	5,54 \pm 0,43	12,83 \pm 0,06	0,94 \pm 0,53
	Con aplicación de salvia post-cosecha	14	5,66 \pm 0,54	13,30 \pm 0,56	0,74 \pm 0,56

Tabla 4.7. Coordenadas CIElab e índice de color en melocotones cv. Miraflores tratados o no tratados con extractos vegetales en precosecha y tratados o no tratados con extracto de salvia en post-cosecha

LOTE	SUBLOTE	Días a ± 1 °C	Parámetros					
			L*	a*	b*	C	h	IC ¹
Arboles sin tratamiento de extractos en precosecha	Sin aplicación de salvia post-cosecha	0	64,7 \pm 3,6	15,7 \pm 3,2	34,0 \pm 5,5	37,7 \pm 4,4	64,7 \pm 7,1	7,14
		14	65,5 \pm 2,9	15,3 \pm 2,4	28,4 \pm 3,5	32,4 \pm 2,5	61,4 \pm 6,1	8,23
	Con aplicación de salvia post-cosecha	14	62,5 \pm 2,2	16,9 \pm 2,2	36,3 \pm 4,8	40,2 \pm 4,2	64,7 \pm 4,6	7,49
Arboles con tratamiento de extractos en precosecha	Sin aplicación de salvia post-cosecha	0	66,3 \pm 3,1	14,2 \pm 2,8	31,9 \pm 3,9	35,2 \pm 2,7	65,7 \pm 6,6	6,71
		14	65,6 \pm 3,8	14,1 \pm 2,6	27,8 \pm 4,1	31,4 \pm 2,8	62,6 \pm 7,5	7,73
	Con aplicación de salvia post-cosecha	14	64,9 \pm 2,7	13,8 \pm 1,7	30,1 \pm 2,8	33,2 \pm 2,4	65,5 \pm 3,8	7,08

¹ Índice de color (Thompson, 1998): IC = 1000 · a*/(L* · b*)

En cuanto a la actividad respiratoria y producción de etileno a los catorce días, según la Tabla 4.8 no se aprecian diferencias entre los diferentes sublotes en ambos parámetros medidos, excepto en el caso de los árboles tratados con extractos precosecha sin aplicación de salvia en post-cosecha (0,563 μ L/kg·h).

Tabla 4.8. *Parámetros fisiológicos (actividad respiratoria y producción de etileno) en melocotones cv. Miraflores tratados o no tratados con extractos vegetales en precosecha y tratados o no tratados con extracto de salvia en post-cosecha*

LOTE	SUBLOTE	ACTIVIDAD RESPIRATORIA		PRODUCCIÓN DE ETILENO ($\mu\text{L/kg}\cdot\text{h}$)
		mL O ₂ /kg·h	mL CO ₂ /kg·h	
Arboles sin tratamiento de extractos en precosecha	Sin aplicación de salvia post-cosecha	41,83 \pm 5,78	34,70 \pm 4,35	0,850 \pm 0,04
	Con aplicación de salvia post-cosecha	46,99 \pm 1,00	38,63 \pm 1,15	0,863 \pm 0,09
Arboles con tratamiento de extractos en precosecha	Sin aplicación de salvia post-cosecha	45,43 \pm 1,36	38,90 \pm 2,27	0,563 \pm 0,05
	Con aplicación de salvia post-cosecha	44,72 \pm 4,08	37,20 \pm 3,05	0,783 \pm 0,05

4.5. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *IN VIVO*

Para determinar que tratamiento post-cosecha era más eficaz en dificultar la aparición de podredumbres se llevaron a cabo dos estudios diferentes.

Para el **estudio A** (determinar si sólo con tratamiento post-cosecha a base de extracto es suficiente para prevenir la aparición de podredumbres) se han encontrado la siguiente comparativa de RR:

$$RR = \left(\frac{P(\text{fruta sana tratada con salvia en postcosecha})}{P(\text{fruta sana tratada con ácidos orgánicos en postcosecha})} \right)_{\text{sin tratamiento precosecha}}$$

Cuando $RR = 1$, significa que se tiene la misma probabilidad de tener fruta sana aplicando salvia en post-cosecha como con una desinfección a base de ácidos orgánicos. Cuando $RR > 1$ implica que la probabilidad de tener fruta sana es mayor si se aplica salvia que si se realiza un tratamiento con ácidos orgánicos, y viceversa cuando $RR < 1$.

Para el caso de la comparación de $P(\text{salvia})/P(\text{acético})$ se puede observar que, en términos generales, tanto de pulverización como en la inmersión, el ácido acético tiene un mejor efecto de control que la salvia, salvo para el caso del RR a 6 y 7 días con una dosis al 1%.

Si se compara $P(\text{salvia})/P(\text{peracético})$, en términos generales es la salvia la que mejor efecto control tiene, salvo para el caso de la inmersión a los 6 y 7 días, pero los valores de estos RR es cercano a 1, por lo que se podría admitir esta generalización. Cabe destacar los valores de

RR > 3 cuando se compara la pulverización con peracético a 260 ppm. Lo que supone una diferencia significativa (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Estudio A correspondiente al riesgo relativo entre los arboles no tratados con extractos en campo y los diferentes tratamientos post-cosecha (salvia y Sanoxol y Tsunami por pulverización a inmersión) aplicados en un periodo de 5-7 días.

ESTUDIO A (Riesgo Relativo)		Salvia vs. Acético				Salvia vs. Peracético			
		Pulverización (5'')		Inmersión (3')		Pulverización (5'')		Inmersión (3')	
		0,5 %	1 %	0,5 %	1 %	260 ppm	520 ppm	260 ppm	520 ppm
Arboles sin tratamiento de extractos vegetales en campo	5 días	0,93	1,06	0,85	0,83	1,16	3,14	1,1	0,99
	6 días	0,9	1,45	0,9	1,05	1,3	3,17	0,94	1,25
	7 días	0,79	1,26	0,85	0,94	1,72	1,48	0,91	1,02

Como conclusión preliminar se podría indicar que para la prevención de hongos de podredumbre a base de tratamientos sólo de post-cosecha, lo conveniente sería:

$$\text{Peracético} < \text{salvia} < \text{acético}$$

Para el **estudio B** (estudiar el efecto combinado de tratamientos en campo a base de extractos más el tratamiento en post-cosecha a base de extracto de salvia mejoran la prevención o resistencia a la aparición de podredumbres) la comparativa fue:

$$RR = \left(\frac{P(\text{fruta sana tratada con salvia en postcosecha})}{P(\text{fruta sana tratada con ácidos orgánicos en postcosecha})} \right)_{\text{con tratamiento precosecha}}$$

Los resultados de las diferentes comparativas o RR se muestran en la Tabla 4.10. Puede observarse como en todos los casos, los RR > 1 implican que la combinación de tratamientos precosecha a base de aplicación de extractos, junto la aplicación en central de salvia, mejora significativamente la prevención de mohos de podredumbre. Son especialmente significativos los valores de RR > 2 en el tratamiento de pulverización con peracético a 260 ppm.

Tabla 4.10. Estudio B, correspondiente al riesgo relativo entre los arboles tratados con extractos en campo y los diferentes tratamientos post-cosecha (salvia y Sanoxol y Tsunami por pulverización a inmersión) aplicados en un periodo de 5-7 días.

ESTUDIO B (Riesgo Relativo)		Salvia vs. Sanoxol				Salvia vs. Tsunami			
		Pulverización (5'')		Inmersión (3')		Pulverización (5'')		Inmersión (3')	
		0,5 %	1 %	0,5 %	1 %	260 ppm	520 ppm	260 ppm	520 ppm
Arboles con tratamiento de extractos vegetales en campo	5 días	1,33	1,27	1,33	1,16	1,61	2,31	1,25	1,5
	6 días	1,2	1,27	2,04	1,28	1,02	2,94	1,09	1,09
	7 días	1,39	1,68	1,33	1,04	1,26	2,21	1,13	1

Sisquella *et al.* (2013) investigaron la combinación de ácido peracético con tratamientos térmicos usando agua caliente con el objetivo de controlar la podredumbre marrón en melocotones Mountain Gold. Los resultados mostraron un descenso en la incidencia de *M. fructicola* en un 65 % a una concentración de 100 ppm de ácido peracético a 20 °C en melocotones. Al aumentar la concentración en 200-300 ppm, el nivel de incidencia de la enfermedad bajó a 25 %, sin diferencias significativas entre ambas concentraciones. Los resultados fueron similares al aumentar la temperatura 40-50 °C. Sholberg *et al.* (1996) estudiaron si la fumigación de melocotones con ácido acético inhibía el desarrollo de *M. fructicola* sin causar daño perjudicial al fruto. Los resultados mostraron que los melocotones, en los cuales se les inoculó el hongo, no se deterioraron tras aplicar una dosis de 1,32-5,30 ppm de ácido acético, con un 100 % de inhibición, y un 28 % de incidencia de *Monilinia* si no se aplica dosis. En cuanto a la aplicación en post-cosecha de salvia para prevenir el efecto de la podredumbre marrón, no se han encontrado estudios que puedan comparar nuestros resultados.

5. CONCLUSIONES

- a. El contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos comerciales fue muy baja en comparación con la de los extractos obtenidos en laboratorio. Además, no se detectó ningún compuesto bioactivo de los analizados (eugenol, cumarina, terpinen-4-ol, geraniol, linalol, timol, limoneno y α -pineno). Este hecho puede deberse al solvente empleado en la extracción, que en el caso de los extractos comerciales pensamos que es agua sin adicción de ningún otro solvente más polar y con una mayor capacidad de extracción, mientras que en los extractos de laboratorio se empleó una mezcla metanol:agua (80:20).
- b. Los extractos comerciales presentaron actividad antimicrobiana frente a *M. fructicola* y *M. laxa*, especialmente el extracto de salvia y frente a esta última especie. Sin embargo, el bajo contenido en compuestos fenólicos y la ausencia de compuestos bioactivos, reconocidos por sus propiedades antimicrobianas, nos hace presuponer que la actividad de protección de los cultivos que poseen estos extractos pueda ser debida a la existencia de otros compuestos que inducen resistencia en la planta, a una acción de biocontrol o a la combinación de ambos.
- c. Dentro de la microbiota del extracto de salvia detectamos una bacteria con actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *M. fructicola* que fue identificada como *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, perteneciente por tanto, a un género con conocidas especies estudiadas como agentes de biocontrol, y que podría contribuir a los efectos antifúngicos de estos extractos.
- d. La aplicación de ácido acético resultó más eficaz que el tratamiento con extracto de salvia para prevenir la aparición de podredumbres post-cosecha. No obstante, si la aplicación de salvia en post-cosecha se combina con el tratamiento con extractos vegetales en precosecha se mejora significativamente el control de las podredumbres en post-cosecha.
- e. Este estudio deja abierta la posibilidad de determinar otros principios activos en los extractos comerciales, que no han sido analizados en este proyecto y que pudieran presentar actividad antimicrobiana. También se prevee profundizar en el conocimiento de la microbiota de los extractos para esclarecer el papel de los microorganismos en la protección del fruto.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aedo, S., Pavlov, S., & Clavero, F. (2010). Riesgo relativo y Odds ratio ¿Qué son y cómo se interpretan. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*, 5(1), 51-54.
- Albayrak, S., Aksoy, A., Albayrak, S., & Sagdic, O. (2013). *In vitro* antioxidant and antimicrobial activity of some *Lamiaceae* species. *Iranian Journal of Science and Technology*, 37(A1), 1-9.
- Alimentarius, C. (2005). Norma general del codex para zumos (jugos) y néctares de frutas. *Codex Stan*, 247, 21.
- Beato, M. T. A., Bobillo, M. T. S., & Centeno, L. M. M. (1999). Plantas medicinales españolas. *Achillea millefolium* L. (*Asteraceae*). *Studia botanica*, (18), 117-129.
- Berry, M., 1995. The chamomiles. *Pharmaceutics Journal*, 254, 191-193.
- Bloem, A.; Bertrand, A.; Lonvaud-Funel, A. y De Revel, G. (2007). Vanillin production from simple phenols by wine-associated lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 62-67.
- Bueno-Duarte, Y., & Mendez-Sánchez, S. C. (2015). Efecto del linalool sobre la bioenergética de mitocondrias de hígado de rata. *Vitae*, 22(1), 33-41.
- Byrde, R. J. W., & Willetts, H. J. (2013). *The brown rot fungi of fruit: their biology and control*. Ed. Elsevier.
- Casals, C., Teixidó, N., Viñas, I., Llauredó, S., & Usall, J. (2010a). Control of *Monilinia* spp. on stone fruit by curing treatments: Part I. The effect of temperature, exposure time and relative humidity on curing efficacy. *Postharvest Biology and Technology*, 56(1), 19-25.
- Casals, C., Viñas, I., Landl, A., Picouet, P., Torres, R., & Usall, J. (2010b). Application of radio frequency heating to control brown rot on peaches and nectarines. *Postharvest Biology and Technology*, 58(3), 218-224.
- Chen, W., & Viljoen, A. M. (2010). Geraniol—a review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany*, 76(4), 643-651.
- da Cruz Cabral, L., Pinto, V. F., & Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 1-14.
- D'hallewin, G., Schirra, M., Manueddu, E., Piga, A., & Ben-Yehoshua, S. (1999). Scoparone and scopoletin accumulation and ultraviolet-C induced resistance to postharvest decay in oranges as influenced by harvest date. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(6), 702-707.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660.
- Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española Quimioterapéutica*, 16(4), 385-393.
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., & Jijakli, M. H. (2016). The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 22-29.
- Dugaheh, M. A., Meisami, F., Torabian, Z., & Sharififar, F. (2013). Antioxidant effect and study of bioactive components of *Valeriana sisymbriifolia* and *Nardostachys jatamansi* in comparison to *Valeriana officinalis*. *Pak J Pharm Sci*, 26(1), 53-58.
- Dugrand, A., Olry, A., Duval, T., Hehn, A., Froelicher, Y., & Bourgaud, F. (2013). Coumarin and furanocoumarin quantitation in citrus peel via ultraperformance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(45), 10677-10684.
- Förster, H., Driever, G. F., Thompson, D. C., & Adaskaveg, J. E. (2007). Postharvest decay management for stone fruit crops in California using the “reduced-risk” fungicides fludioxonil and fenhexamid. *Plant Disease*, 91(2), 209-215.
- Fu, W., Tian, G., Pei, Q., Ge, X., & Tian, P. (2016). Evaluation of berberine as a natural compound to inhibit peach brown rot pathogen *Monilinia fructicola*. *Crop Protection*, 91, 20-26.
- García García, R. M., & Palou García, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectivos de Ingeniería de Alimentos*, 2(2), 41-51.
- Garde Izquierdo, G. (2013). Cuantificación de la retención de carvacrol y eugenol durante la formación de películas comestibles activas. *Trabajo Fin de Carrera*. Universidad Pública de Navarra, Pamplona.
- Gatto, M. A., Ippolito, A., Linsalata, V., Cascarano, N. A., Nigro, F., Vanadia, S., & Di Venere, D. (2011). Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest*

- Biology and Technology*, 61(1), 72-82.
- Gell Silvente, I. (2007). Podredumbre parda del melocotonero (*Monilinia spp.*): detección, identificación de especies y contribución a la epidemiología de la enfermedad. *Tesis Doctoral*, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, (2007)
- Ghaedi, M., Naghiha, R., Jannesar, R., & Mirtamizdoust, B. (2015). Antibacterial and antifungal activity of flower extracts of *Urtica dioica*, *Chamaemelum nobile* and *Salvia officinalis*: Effects of Zn [OH] 2 nanoparticles and Hp-2-minh on their property. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 32, 353-359.
- Gil, M. I.; Tomás-Barberán, F; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D. M, Kader, A.A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4581-4589.
- Guerra, G. J., Soto, B. G., Marí, J. M. N., & Fernández, J. G. (2015). Aislamiento de "Magnusiomyces capitatus" en una muestra clínica de orina. *Revista clínica española: publicación oficial de la Sociedad Española de Medicina Interna*, 215(7), 419-421.
- Hart, P. H., Brand, C., Carson, C. F., Riley, T. V., Prager, R. H., & Finlay-Jones, J. J. (2000). Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research*, 49(11), 619-626.
- Hou, D. Y., Yan, C. Q., Liu, H. X., Ge, X. Z., Xu, W. J., & Tian, P. F. (2010). Berberine as a natural compound inhibits the development of brown rot fungus *Monilinia fructicola*. *Crop Protection*, 29(9), 979-984.
- Jiménez, E. V., & Mosquera, O. M. (2015). Actividad antifúngica *in vitro* de tres extractos de plantas frente a *Botrytis cinerea* (moho gris). *Salud & Sociedad*, 1(2).
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954-3962.
- Kang, H. C., Park, Y. H., & Go, S. J. (2003). Growth inhibition of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum* species by acetic acid. *Microbiological Research*, 158(4), 321-326.
- Karabulut, O. A., Smilanick, J. L., Crisosto, C. H., & Palou, L. (2010). Control of brown rot of stone fruits by brief heated water immersion treatments. *Crop Protection*, 29(8), 903-906.
- Karabulut, O. A., & Baykal, N. (2003). Biological control of postharvest diseases of peaches and nectarines by yeasts. *Journal of Phytopathology*, 151(3), 130-134.
- Larena, I., Torres, R., De Cal, A., Liñán, M., Melgarejo, P., Domenichini, P., & Usall, J. (2005). Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia spp.*) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biological Control*, 32(2), 305-310.
- Lazar oil samples on the growth of postharvest pathogen *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey. *Letters in Applied Microbiology*, 52(3), 227-232. -Baker, E. E.
- Lleó García, L., Valero Ubierna, C., & Ruiz-Altisent, M. (1999). Parámetros de calidad organoléptica en el melocotón. *Fruticultura Profesional*, (101), 69-79.
- Llorach, R.; Tomás-Barberán, F; Ferreres, F. (2004). Letuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5109-5116.
- López, E. F., & Gómez, E. F. (2000). Comparison of solvents for determination of monoterpenes in wine using liquid-liquid extraction. *Chromatographia*, 52(11-12), 798-802.
- Martínez, A. (1996). Aceites esenciales. *Journal of Natural Products*, 59(1), 77-79.
- Martínez J. A. 2012. Natural fungicides obtained from plants. In: Fungicides for Plant and Animal Diseases. Dhanasekaran D. (Eds.), www.intechopen.com, 3-28.
- Meziani, S., Oomah, B. D., Zaidi, F., Simon-Levert, A., Bertrand, C., & Zaidi-Yahiaoui, R. (2015). Antibacterial activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) extracts against phytopathogenic bacteria *Pectobacterium atrosepticum*. *Microbial pathogenesis*, 78, 95-102.
- Muñoz, Z., Moret, A., & Bech, J. (2008). Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Monilinia spp.* y pruebas de patogenicidad sobre manzana. *Agrociencia*, 42(1), 119-128.
- Nicosia, M. G. L. D., Pangallo, S., Raphael, G., Romeo, F. V., Strano, M. C., Rapisarda, P., & Schena, L. (2016). Control of postharvest fungal rots on citrus fruit and sweet cherries using a pomegranate peel extract. *Postharvest Biology and Technology*, 114, 54-61.

- Nováková, L., Spáčil, Z., Seifrtová, M., Opletal, L., & Solich, P. (2010). Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures. *Talanta*, 80(5), 1970-1979.
- Oliveros-Bastidas, A., Cordero, I., Paredes, D., Buendia, D., & Macías Domínguez, F. A. (2011). Extracción y cuantificación de cumarina mediante HPLC-UV en extractos hidroetanólico de semillas de *Dipteryx odorata*. *Revista Latinoamericana de Química*, 39(1-2), 17-31.
- Pandey, R., Chandra, P., Srivastava, M., Mishra, D. K., & Kumar, B. (2015). Simultaneous quantitative determination of multiple bioactive markers in *Ocimum sanctum* obtained from different locations and its marketed herbal formulations using UPLC analysis. *Phytochemical Analysis*, 26(6), 383-394.
- Peiró, P. S., Galve, J. J. G., & Lucas, M. O. (2010). Monográfico de *Hypericum perforatum* L. *Medicina Naturista*, 4(2), 5-10.
- Pérez-Urria Carril, E., & Ávalos García, A. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*, 2(3), 119-145.
- Phytobotanical and ethnobotanical databases del Agricultural Research Service del USDA (United States Department of Agriculture)
- Poniatowska, A., Michalecka, M., & Bielenin, A. (2013). Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 135(4), 855-865.
- Porel, A., Sanyal, Y., & Kundu, A. (2014). Simultaneous HPLC determination of 22 components of essential oils; method robustness with experimental design. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(1), 19.
- Pusey, P. L., & Wilson, C. (1984). Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease*, 68(9), 753-756.
- Rodicio, M.d.R. & Mendoza M.d.C., (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4): p. 238-245.
- Rojas, J. P., Perea, J. A., & Ortiz, C. C. (2009). Evaluación de la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- α -pineno empleando células de *Rhodococcus opacus* DSM 44313. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 7(2), 104-112.
- Rojo del Olmo, L. (2008). Derivados poliméricos del Eugenol para aplicaciones biomédicas, *Tesis Doctoral*, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, (2008)
- Sanzani, S. M., Schena, L., De Girolamo, A., Ippolito, A., & González-Candelas, L. (2010). Characterization of genes associated with induced resistance against *Penicillium expansum* in apple fruit treated with quercetin. *Postharvest Biology and Technology*, 56(1), 1-11.
- Sauceda, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170.
- Sholberg, P. L., & Gaunce, A. P. (1996). Fumigation of stone fruit with acetic acid to control postharvest decay. *Crop Protection*, 15(8), 681-686.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- Sistrom, C. L., & Garvan, C. W. (2004). Proportions, odds, and risk 1. *Radiology*, 230(1), 12-19.
- Thompson, A. K. (1998). Tecnología post-cosecha de frutas y hortalizas. Armenia, Colombia: Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). Editorial Kinesis, Armenia, Colombia. 268.
- Vázquez, J. F. G. (2009). Interés farmacéutico de la "Salvia officinalis" y de la "Euphrasia officinalis". Cuadernos del Tomás, (1), 157-171.
- Usall, J., Ippolito, A., Sisquella, M., & Neri, F. (2016). Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 30-40
- Vaidya, B. N., Brearley, T. A., & Joshee, N. (2014). Antioxidant capacity of fresh and dry leaf extracts of sixteen *Scutellaria* species. *Journal of Medicinally Active Plants*, 2(3), 4.
- Xu, X. M., & Robinson, J. D. (2000). Epidemiology of brown rot (*Monilinia fructigena*) on apple: infection of fruits by conidia. *Plant Pathology*, 49(2), 201-206.
- Yáñez-Mendizábal, V., Zerrouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., & Teixidó, N. (2012). Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-

-ESI - M S M

like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*, 132(4), 609-619.

Zhou, T., Schneider, K. E., & Li, X. Z. (2008). Development of biocontrol agents from food microbial isolates for controlling post-harvest peach brown rot caused by *Monilinia fructicola*. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1), 180-185.